UNIVERSITE PARIS–SUD
UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNEE : 1971–1972 SERIE U. N° 1

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITE PARIS–SUD

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
(Mention Pharmacie)

par

Van Lan DAO
Pharmacien

Diplômé de Bactériologie, d'Immunologie et de Sérologie de l'Institut Pasteur
C.E.S. d'Hématologie, de Parasitologie et de Chimie organique
Assistant au Laboratoire des Actions de Santé - Section Virologie

CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION, PAR LES MARQUEURS HL-A, DES CELLULES HUMAINES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DES VACCINS VIRAUX

soutenue le 3 octobre 1972

JURY : M. A. GERMAN Président
M. J. COLOMBANI Examinateurs
M. J. BORY
M. R. NETTER Examinateur invité

Copédith - Paris - 202.03.97

UNIVERSITE PARIS–SUD
UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNEE : 1971–1972

SERIE U. N° 1

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
DE L'UNIVERSITE PARIS–SUD

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
(Mention Pharmacie)

par

Van Lan DAO
Pharmacien

Diplômé de Bactériologie, d'Immunologie et de Sérologie de l'Institut Pasteur
C.E.S. d'Hématologie, de Parasitologie et de Chimie organique
Assistant au Laboratoire des Actions de Santé - Section Virologie

CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION, PAR LES MARQUEURS HL-A, DES CELLULES HUMAINES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DES VACCINS VIRAUX

soutenue le 3 octobre 1972

JURY : M. A. GERMAN — Président
M. J. COLOMBANI — Examinateurs
M. J. BORY
M. R. NETTER — Examinateur invité

Copédith - Paris - 202.03.97

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

" Le plus grand dérèglement de l'esprit , c'est de croire les choses parce qu'on veut qu'elles soient . "

BOSSUET

A la mémoire de mes Parents

A ma tante

A ma femme et ma fille

A tous les miens

A mes amis

A notre Président de Thèse

Monsieur A. GERMAN

Professeur de Microbiologie à l'Université de Paris Sud
Pharmacien en Chef des Hôpitaux de Paris
Membre de l'Académie de Pharmacie

qui nous fait l'honneur de présider notre Jury et de juger ce travail
En témoignage de notre respectueuse reconnaissance .

A Monsieur J. COLOMBANI

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris VII

qui nous a accueilli dans son laboratoire, prodigué ses encouragements et conseils . Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement .

A Monsieur J. BORY

Professeur de Microbiologie à l'Université René Descartes
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

Nous le remercions de l'attention qu'il a bien voulu nous témoigner en acceptant de juger ce travail .

A Monsieur R. NETTER

Directeur de la Section Virologie
Laboratoire des Actions de Santé

qui nous a proposé le sujet de notre travail et suivi avec intérêt sa progression, sans cesser de nous réserver une grande bienveillance .
En témoignage de notre profonde gratitude .

A Monsieur J. DAUSSET

Professeur d'Immuno-Hématologie
Hôpital Saint Louis - Paris
qui nous a admis dans son Service et dispensé son enseignement
En témoignage de notre respectueuse reconnaissance .

A Monsieur J. HORS

Assistant des Hôpitaux de Paris
Laboratoire d'Immuno-Hématologie - Hôpital Saint Louis, Paris
qui nous a reçu dans son laboratoire et nous a fait partager les joies et les peines de la cytotoxicité. Avec nos sincères remerciements .

A Madame M. COLOMBANI

Laboratoire d'Immuno-Hématologie
Hôpital Saint Louis - Paris
qui nous a fourni les immunsérums nécessaires à notre travail
Respectueux hommages .

Au Personnel du Service du Professeur Dausset

Au Personnel du Laboratoire des Actions de Santé, Section Virologie

qui nous ont aidé à l'élaboration de ce travail
Nos remerciements sincères .

1. INTRODUCTION

L'emploi intensif des cellules rénales simiennes en virologie a fait découvrir que le singe pouvait être porteur de toute une série de virus latents. En 1960, SWEET et HILLEMAN (150) décrivirent un nouveau virus du singe dénommé SV-40 d'après la classification de HULL (80), ne provoquant pas d'effet cytopathique spontané des cellules rénales mais donnant des vacuoles sur cellules de rein de singes Rhésus, Cynomolgus (150) et Patas (78).

Ce virus SV-40, retrouvé aux USA dans des lots de vaccins antipoliomyélitiques - fabriqués à partir de reins de singes Rhésus et inactivés par le formol - a suscité des inquiétudes quant à son devenir dans l'organisme humain (110) ; en effet, s'il n'induit qu'une faible infection chez les adultes humains inoculés par voie nasale, il provoque en revanche par cette même voie la formation de sarcomes transplantables chez le hamster nouveau-né (50) et la transformation in vitro des cellules (45). De plus, on sait que les cellules humaines infectées peuvent se multiplier indéfiniment avec l'antigène T nucléaire. L'effet oncogénique (113) fut retrouvé aussi avec des Adénovirus d'origine simienne (49, 79, 81) et des hybrides Adéno-SV-40 (125).

D'autres virus ont été découverts ensuite chez le singe : cytomégalovirus (13) virus de MARBURG (139, 142) et virus B (17, 127), ces deux derniers ont entraîné à plusieurs reprises des maladies extrêmement sévères de l'homme.

A la suite de ces observations, les contrôles furent certes renforcés mais, pour éviter le risque d'introduction dans les vaccins viraux d'autres agents latents inconnus inducteurs de transformation ou de viroses, la question s'est posée d'abandonner les cellules de primo explantation et d'adopter des souches cellulaires dont la pureté a été établie préalablement à leur emploi.

Après avoir fait la comparaison entre cellules simiennes et humaines (72, 73) pour la préparation de vaccins, HAYFLICK a préféré affronter l'immunisation isologue et se tourner vers les cellules souches humaines diploïdes. Après une étude minutieuse de plusieurs souches, cet auteur a proposé d'adopter la souche WI-38 (74) provenant de la culture du poumon d'un foetus et exempte de tout agent latent dans les limites actuelles de la science. Cette pureté fut vérifiée par d'autres grands Laboratoires internationaux et l'absence du virus de l'hépatite a même été démontrée par les résultats actuels d'inoculations à l'homme de vaccins fabriqués à partir de WI-38 (82)

Une autre souche cellulaire, dénommée MRC-5, a franchi aussi avec succès le cap des contrôles exigés pour la fabri-

cation de vaccins (83) mais l'absence du virus de l'hépatite n'a pas encore été vérifiée chez l'homme.

Les examens de laboratoire actuellements pratiqués ont pour but de s'assurer de l'absence de contaminants, de l'impossibilité de transmettre un quelconque pouvoir oncogène et de la stabilité du caryotype (nombre de chromosomes et anomalies diverses).

Il est apparu cependant que tous ces caractères ne constituaient pas une véritable identification et que des examens immunologiques permettant de distinguer plusieurs cellules humaines entre elles étaient nécessaires.

Plusieurs procédés ont été proposés (151) : hémagglutination, agglutination, hémadsorption, immunofluorescence, mais aucun n'a été retenu par le Comité International de Cellules.

Pour compléter l'identification de la cellule humaine en culture, nous nous proposons de faire appel ici aux antigènes du système HL-A, puisque des publications antérieures ont montré que leur détection était possible après un certain nombre de passages (92, 93).

Après un exposé général sur le système complexe d'antigènes de greffe HL-A, nous décrivons les méthodes de fixation du complément sur plaquettes et de lymphocytotoxicité ainsi que leur adaptation aux souches de fibroblastes étudiées. Les résultats obtenus sont ensuite discutés.

II. NOTIONS GENERALES SUR LE SYSTEME HL-A

Les groupes d'antigènes leucocytaires n'ont été mis en évidence tardivement qu'à partir des années 50 ; la séparation des leucocytes était à ses débuts, de même que la leuco-agglutination (30). La préhistoire des groupes leucocytaires (165) commençait avec les travaux consacrés aux mécanismes auto-immunitaires dans les hémopathies, puis DAUSSET et coll. (31) en 1954 montraient que les agglutinines leucocytaires n'étaient pas des auto-anticorps mais des iso-anticorps suscités par des transfusions multiples (32).

En 1958, DAUSSET (32) montra l'existence de l'antigène Mac (HL-A2) dans 60 % de la population française. L'amélioration des techniques et la découverte des anticorps anti-leucocytaires relativement monospécifiques chez les multipares (114, 169) facilitèrent la description de la plupart des antigènes HL-A.

Les antigènes du système HL-A (Human Leucocyte, la lettre A définissant ce premier système) sont l'expression de gènes groupés en deux séries alléliques à deux loci étroitement liés d'un autosome (87). La représentation actuelle - composée d'une trentaine de spécificités qui ne sont pas encore toutes décrites - est figurée au tableau 1.

Les cellules porteuses étant diploïdes, avec deux gènes par locus, chaque individu doit posséder au moins deux antigènes (homogygotisme aux deux loci) et au plus quatre (double hétérozygotisme).

TABLEAU 1

Antigènes du système HL-A
(Mai 1972)

Ph	G	1er locus	Ph	G	2è locus
214	113	HL-A 1	326	181	HL-A12
235	125	HL-A 3	47	23	HL-A13
121	61	HL-A11 (Da12)	144	72	W18
460	268	HL-A 2	141	75	HL-A 5
74	38	HL-A28 (Da 2)	185	97	W 5 (Da 6)
250	136	HL-A 9 { W23	115	57	W15
		W24	65	32	W21 (Da19)
129	64	HL-A10 { W25 W26	67	33	HL-A17
105	54	W29	195	103	HL-A 7
130	45	Da25 { W30 W31 (W19)	132	68	W10 (Da 9)
			72	36	HL-A27
69	36	W32	63	31	W22
			139	68	HL-A 8
			100	51	W14
			61	28	W16 > Da31
177	88	X_1	123	61	X_2

Ph : fréquence phénotypique pour mille
G : fréquence génotypique pour mille
} : réunit les antigènes présentant entre eux des réactions croisées
X : spécificités non encore décrites aux deux loci
HL-A : nomenclature officielle
Da, W : nomenclature provisoire

Onze antigènes sont actuellement reconnus sérologiquement et déterminés par onze gènes alléliques au 1er locus. Dix sept allèles gouvernent les dix sept antigènes du 2è locus. Il reste à décrire les allèles hypothétiques X1 et X2 aux deux loci. D'autre part, il a été suggéré que le système HL-A possède d'autres loci (37, 88, 168).

L'étude des fréquences haplotypiques (36, 39) ont montré qu'il existe un déséquilibre de "linkage" entre les deux loci et on observe des combinaisons plus fréquentes que ne le voudrait le hasard : par exemple HL-A 1, 8 et HL-A 3, 7.

Les combinaisons de deux gènes à chacune des deux séries peuvent donner lieu, en tenant compte de onze gènes au 1er locus et de dix sept au deuxième, à 17.578 génotypes possibles correspondant à 7.672 phénotypes possibles. Ces chiffres permettent de déduire le degré de probabilité de trouver deux individus antigéniquement identiques.

En 1968, la première réaction croisée fut décrite (35, 145) entre HL-A2 et Da 15 (HL-A 28). C'est une notion très importante dans la définition du système HL-A. Il existe ainsi un "long" anticorps (anti Da 2) recouvrant les deux spécificités HL-A2 et HL-A 28 et entièrement adsorbable sur les cellules ne portant qu'un de ces deux antigènes. Les trois immunsérums se comportant comme monospécifiques, mais la réactivité de l'anti-HL-A 28 est "incluse" dans l'anti-Da 2 (absence d'individu HL-A 28 +, Da 2 -), de même l'anti HL-A 2 est inclus dans l'anti Da 2. L'anti HL-A 28 est adsorba-

ble sur des cellules HL-A 28 -,HL-A 2 +, de même l'anti HL-A2 est adborbable sur des cellules HL-A2-,HL-A 28 +. Ces trois spécificités représentant le groupe de réactions croisées Da2 (GREC Da 2). D'autres GREC sont signalés dans le tableau 1 par une accolade.

Les divers antigènes du GREC auraient une partie commune responsable des réactions croisées et une structure particulière responsable de la spécificité restreinte. Sur le plan sérologique, il faut noter qu'une certaine "asymétrie" existe entre ces réactions croisées : par exemple dans le GREC Da 12 composé des antigènes HL-A3 et HL-A 11 un sérum anti HL-A3 pouvait être adsorbé sur des cellules HL-A3 -,HL-A 11 + alors qu'un sérum anti HL-A 11 ne pouvait être adsorbé sur des cellules HL-A 3 +,HL-A 11 - (39). Il n'a pas été observé de réaction croisée entre spécificités du 1er et du 2è locus.

Le système HL-A est complètement indépendant vis-à-vis d'autres marqueurs génétiques : ABO, Rhésus, MNSs, Duffy, Lewis, Kidd, système plaquettaire Ko, les systèmes de groupes sériques Gm, Gc, Inv, Isf, Lp, Ag, les systèmes d'enzymes érythrocytaires : phosphatases acides A, B, C et phosphoglucomutase 2.

L'existence d'une liaison entre HL-A et la phosphoglucomutase 3 érythrocytaire ainsi qu'avec la chaîne α de l'haptoglobine resterait à démontrer pour placer HL-A sur une des trois paires de chromosomes du groupe E. Tous les espoirs en cette matière sont mis dans les expériences d'hybridations

cellulaires interspécifiques en cours.

Les antigènes HL-A sont des antigènes tissulaires retrouvés sur les cellules de nombreux tissus : placenta, rate (162) coeur, foie, poumon (11) rein (12) cellules de culture, endothélium des vaisseaux, thrombocytes, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, épiderme (56) fibroblastes (53) spermatozoïdes (39). Sur ces derniers, l'expression des antigènes serait haploïde : les gênes d'un haplotype s'expriment sur la moitié des spermatozoïdes, ceux de l'autre haplotype sur le restant. La présence des antigènes HL-A sur la membrane des hématies reste controversée car les résultats observés sont douteux (124) alors que les réticulocytes semblent posséder ces antigènes (71). Il est possible qu'il s'agisse dans ce cas d'une expression différente des antigènes.

L'évaluation quantitative de l'antigène HL-A2 dans divers tissus a montré que la rate serait l'organe le plus riche et le cerveau le plus pauvre avec absence de l'antigène dans les graisses (12).

Les études biochimiques des antigènes HL-A ont été faites à partir des plaquettes, de cellules spléniques (43, 44) et de cellules lymphoïdes de culture (98, 106, 119, 153) après sonication, extraction par les détergents comme le Triton ou par les solvants organiques comme le butanol et par dégradation enzymatique par la papaïne.

L'antigène soluble peut être extrait par une solution de KCL 3 M à partir des cellules lymphoïdes ; c'est une molécule de PM # 50.000 dans laquelle les hydrates de carbone ne sont pas essentiels pour l'activité antigénique et tous les chercheure semblent reconnaître que les déterminants antigéniques HL-A sont de nature polypeptidique. Cet antigène soluble est stable pendant plus de dix mois à -20° C.

La protéïne M1 des Streptocoques β-hémolytiques du groupe A1 (76, 77, 118) ainsi que les antigènes lipopolysaccharidiques de certaines souches d'E. coli et de Salmonella (105) ont inhibé l'action cytotoxique de multiples variétés d'anticorps anti HL-A. Ces observations suggèrent que les gènes du système HL-A produiraient une substance de base sur laquelle se grefferait la molécule spécifique de chaque antigène.

Méthodologie

Les méthodes d'étude des antigènes HL-A s'étendent sur un champ très vaste et les moyens d'accès sont aussi nombreux que variés.

Quatre techniques de base sont employées couramment dans la sérologie leuco-plaquettaire : leuco-agglutination, lymphocytotoxicité, thrombo-agglutination et réaction de fixation du complément sur plaquettes.

Les autres méthodes s'adressent aux cas où les procédés classiques sont insuffisants pour surmonter les difficultés ou aux recherches fondamentales.

Le matériel à étudier, constitué de leucocytes et de plaquettes, se caractérise par sa fragilité et sa faible concentration dans le sang total dont il doit être extrait.

Préparation des suspensions leucocytaires

Les méthodes utilisées par divers auteurs (99, 165) suivent les mêmes principes. Les leucocytes sont séparés à partir du sang total hépariné ou défibriné par agitation avec des petites billes de verre. Une première méthode consiste à utiliser un mélange de méthyl-cellulose et de métrisoate de sodium de densité 1080 ; c'est la méthode par flottation (16) : le sang est déposé à la surface du mélange puis centrifugé, les érythrocytes sédimentent au fond du tube et les leucocytes se rassemblent à l'inter-face. Cette méthode peut être adaptée à la séparation directe des lymphocytes utilisés dans les réac-

tions de cytotoxicité ; elle permet de récupérer jusqu'à 80 % des lymphocytes.

Une deuxième méthode consiste à accélérer la sédimentation érythrocytaire par formation de rouleaux d'hématies en présence d'une substance macro-moléculaire (dextran, PVP) ajoutée au sang. Après sédimentation, le surnageant contient les leucocytes mélangés à un résidu d'hématies ; cependant cette préparation peut être utilisée dans la technique de leuco-agglutination. La séparation des cellules lymphoïdes et des granulocytes peut être effectuée en utilisant la propriété des neutrocytes d'adhérer aux surfaces diverses : verre, coton, nylon (68, 85)

Les suspensions leucocytaires obtenues doivent être utilisées dans les heures qui suivent le prélèvement ou conservées dans l'azote liquide.

Techniques de leuco-agglutination

C'est la méthode la plus ancienne, se subdivisant en deux variétés suivant la présence ou l'absence de complément :

- la leuco-agglutination à partir du sang défibriné (LAD) c'est la méthode de DAUSSET (30, 31) conservant le complément

- la leuco-agglutination à partir du sang séquestréné (LAS) suivant la technique de VAN LOGHEM - VAN ROOD (162, 163) où le complément n'intervient pas en raison de l'absence de Ca^{++} nécessaire à son action.

De ces deux techniques, il existe de nombreuses variantes (115) qui consistent à mettre en contact une goutte de suspension leucocytaire fraîche avec une goutte de sérum antileucoplaquettaire inactivé au préalable à 56° C ; après incubation à 37 ° C, la suspension est examinée sous un faible grossissement microscopique. L'agglutination traduit la réaction antigène-anticorps.

La présence de complément influence le résultat aussi les deux techniques possèdent une sensibilité différente. La LAD est la plus sensible comme méthode de détection de l'immunisation anti-leucocytaire, cependant elle peut donner des fausses réactions positives tout en exigeant des cellules très fraîches ; tandis que la LAS est plus reproductible et son intérêt réside dans une définition différente du système HL-A, elle esttoujours employée dans le Laboratoire de VAN ROOD.

En raison de la faible reproductibilité et la difficulté de définir avec cette méthode des spécificités de faible fréquence, la leuco-agglutination fut supplantée par la réaction de cytotoxicité.

Techniques de lympho-cytotoxicité

Le principe de la cytotoxicité a été établi par GORER et O'GORMAN (67) chez la souris. Actuellement, c'est la méthode la plus couramment utilisée pour le groupage leucocytaire.

Les anticorps anti-leucocytaires sont généralement capables, en présence de complément, de tuer les cellules cibles

porteuses des antigènes spécifiques. La cytolyse se limite souvent à une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire à un colorant macro-moléculaire (bleu trypan ou éosine). Le pourcentage de cellules colorées, évalué au microscope (microscope ordinaire pour le bleu trypan, microscope à contraste de phase pour l'éosine), traduit l'action cytotoxique de l'anticorps.

Un chapitre spécial est réservé plus loin à cette méthode.

La cytolyse peut être révélée par d'autres techniques : Dans la fluochromasie, en présence de diacétate de fluorescéine, les lymphocytes vivants sont fluorescents car le produit a été transformé en fluorescéine ; les cellules mortes restent ternes. Cette technique est aussi utilisée par certains auteurs pour grouper les lymphocytes (15 , 159) et les fibroblastes de culture (102)

Dans les réactions d'élution au chrome - 51, on utilise le traceur radio-actif sous forme de $^{51}Cr\ Cl_3$. La réaction directe est effectuée avec des lymphocytes marqués au radio-isotope artificiel puis, après l'action de l'anticorps et du complément, la quantité de lymphocytes tués est déterminée par la radio-activité du surnageant grâce au spectromètre à rayon γ

L'inhibition de la cytotoxicité est utilisée par exemple pour déterminer les activités antigéniques HL-A

séparées par moyens physico-chimiques (121, 122, 128, 129). Ici, les cellules marquées sont ajoutées en même temps que le complément à un mélange d'immun-sérum et d'antigène incubé préalablement.

La réaction d'élution au chrome-51 est d'une grande objectivité et a été employée fréquemment, mais la nécessité de posséder de grandes quantités d'antisérums, souvent rares, d'avoir des préparations d'antigène soluble suffisamment purifié dans le cas de l'inhibition de la cytotoxicité (107) ainsi qu'un appareillage spécial, en limite l'emploi.

Préparation des suspensions plaquettaires

Elle est faite à partir de sang prélevé sur anticoagulant (EDTA Na2 ou solution ACD) en matériel siliconé ou plastique. Le plasma riche en plaquettes est obtenu par centrifugation modérée à + 4°C, le culot plaquettaire par une nouvelle centrifugation plus énergique. Après lavage en soluté physiologique, les plaquettes sont remises en suspension en soluté physiologique contenant 0, 1 % de Na N3 à la concentration d'emploi ; cette préparation est utilisée pour le groupage après 48 heures de conservation à 4°C.

Réactions de thrombo-agglutination

La méthode fut décrite par VAN DER WIEL en 1962 (172) puis modifiée par DAUSSET et coll (33). La réaction peut être faite directement sur le plasma riche en plaquettes ou sur une suspension de plaquettes lavées ; la présence de phénol élimine

les réactions non spécifiques , le sérum est strictement anti-plaquettaire et les thrombo-agglutinines sont des IgM pouvant parfois se diriger contre des sites antigéniques non spécifiques du système HL-A.

Les antigènes Zwa, Zwb et Koa, Kob ont été déterminés par cette méthode.

Réaction de fixation du complément sur plaquettes (RFCPl)

Son principe est classique et ses particularités seront exposées plus loin dans un chapitre spécial. Cette réaction a d'abord été employée par SHULMAN (138) ASTER (3) et VAN DER WEERDT (160) pour l'étude des antigènes plaquettaires puis leucocytaires ; elle fut reprise et utilisée par COLOMBANI sur plaquettes (21) puis employée conjointement à la lympho-cytotoxicité pour la description des antigènes HL-A (37, 38, 147)

L'immuno-adhérence

Son principe a été exposé par NELSON (142) : la suspension cellulaire est mélangée successivement avec l'antisérum, le complément et les cellules indicatrices puis la quantité de rosettes formées par les cellules indicatrices adhérant autour des cellules cibles est dénombrée au microscope (grossissement x 450 ou x 900).

La méthode est utilisée pour la détermination des activités HL-A (64, 108) et des anticorps correspondants. La

complément employé est d'origine humaine ou de cobaye et les cellules indicatrices sont des érythrocytes de primates, de lapin ou humains de groupe O Rhésus +. Les lymphocytes peuvent fonctionner comme antigènes, non les granulocytes ; par contre, ces derniers peuvent jouer le rôle de cellules indicatrices.

La réaction d'immuno-adhérence est très sensible et très spécifique, mais de manipulation difficile et après avoir servi au groupage des lymphocytes périphériques, fibroblastes, cellules épidermiques et rénales (46, 56), elle est surtout appliquée aux recherches et études sur les antigènes solubles.

Les avantages de la méthode seraient les mêmes que pour la réaction mixte d'antiglobuline (135, 136), la conglutination mixte (26) ou les réactions immunologiques avec anticorps marqués, à savoir la possibilité de détection des activités HL-A sur cellules tuées.

En ce qui nous concerne, son principal inconvénient est que les fibroblastes peuvent donner de fausses réactions négatives ou faibles (56).

Autres méthodes

L'immunofluorescence de membrane (66, 97), la microscopie électronique avec anticorps conjugués à la ferritine (89) sont utilisés dans des cas particuliers. L'agglutination mixte par l'antiglobuline (103) est appliquée aux cellules de

culture difficile à grouper par cytotoxicité ou par la réaction de fixation du complément.

La culture mixte de lymphocytes (CML) doit être mise à part. Décrite en 1964 par BAIN et coll (5), appliquée à l'histocomptabilité par BACH (4), la CML est très utilisée pour la stimulation lymphocytaire in vitro et pour étudier les structures des antigènes HL-A. Son principe consiste à mettre en culture mixte des cellules répondantes et des cellules stimulantes dont l'activité est bloquée par la mitomycine ; après 3 à 5 jours de culture, l'incorporation de thymidine tritiée est mesurée au compteur à scintillation, une réponse positive signifie la transformation des cellules repondantes par les antigènes étrangers des cellules stimulantes.

Cependant, les études d'histocomptabilité sur les antigènes HL-A par la CML entre individus phénotypiquement identiques ont montré souvent des stimulations, alors qu'il n'en existe pas entre frères génotypiquement identiques. Ces observations montrent qu'il y a une différence entre les renseignements obtenus par la CML et ceux de la sérologie HL-A leucoplaquettaire. Deux hypothèses pourraient être formulées : (a) l'existence possible d'un locus CML étroitement lié au 2ème locus HL-A car seuls les antigènes du 2ème locus (94) stimulent (b) l'hérérogénéité des antigènes de ce 2è locus HL-A qui va jouer un rôle important dans la mise au point de notre étude.

Les immunsérums

Les premiers furent les agglutinimes leucocytaires polyspécifiques provoquées par transfusions multiples, puis des anticorps relativement monospécifiques chez les multipares. Comme ils demeurent rares, des animaux ont été immunisés en vue d'une production à grande échelle.

Lapins, cobayes, chiens, rats, immunisés avec des thrombocytes ou des leucocytes humains, fournissent des immunsérums de haut titre mais impropres au groupage leucocytaire humain (138). Les lapins ayant subi des allo-greffes de peau fabriqueraient des anticorps capables de détecter les antigènes leucocytaires humains (1).

Les leucocytes de babouins testés avec les immunsérums humains présentent une activité HL-A 7 (70) puis les relations sérologiques entre antigènes lymphocytaires humains, de chimpanzé et de gorille ont été établies (47). L'immunisation des chimpanzés (6) donna finalement les meilleurs résultats et il est reconnu actuellement chez ces animaux quatre antigènes communs à l'homme : HL-A 11, HL-A5, HL-A 17, et W 22.

Ces observations appartiennent encore au domaine de la recherche et les immunsérums utilisés dans la sérologie HL-A proviennent d'allo-immunisations humaines : transfusions, grossesses, transplants et greffes volontaires. Ces diverses sources produisent des réactifs de qualités très variables et les immunsérums les plus puissants sont en même temps les plus polyspécifiques.

Les polytransfusés forment des anticorps anti-leucocytaires et antithrombocytaires qui furent les premiers réactifs employés dans la leuco-agglutination (32). Dix pour cent des personnes fabriquent des anticorps après dix transfusions alors que plus de cinquante pour cent en produisent après cent transfusions. Les sérums obtenus ainsi par immunisations accidentelles sont en général de haut titre et toujours polyspécifiques. Ils sont peu utilisables pour détecter les iso-antigènes leucocytaires même après adsorptions répétées ; par contre, convenablement dilués, les anticorps anti-thrombocytaires peuvent devenir relativement monospécifiques et servir dans la RFCP1 (21, 147).

Les multipares fabriquent des anticorps plus faibles mais leurs sérums sont adoptés par la majorité des auteurs (114, 169) car ils sont beaucoup plus souvent monospécifiques ou peuvent être rendus relativement monospécifiques après adsoptions convenables (155). Les sérums non adsorbés sont excellents pour la réaction de cytotoxicité mais faibles pour la RFC (25). La mère s'immunise au fur et à mesure des grossesses contre les leucocytes foetaux dont la moitié des gènes est d'origine paternelle (75). Les anticorps apparaissent dès le 3è mois de grossesse et disparaissent aux 2è ou 3è mois après l'accouchement. Tous les auteurs n'admettent pas que le risque d'immunisation augmente avec le nombre de grossesses ; la détection des anticorps variant selon la sensibilité de

la technique utilisée, la fréquence d'immunisation est en général de 15-30 %, parfois jusqu'à 50 %.

Les malades transplantés rénaux, après rejet de la greffe, produisent des anticorps cytotoxiques (110) qui n'ont été employés pour le groupage leucocytaire que rarement.

Les donneurs immunisés volontaires fournissent les meilleurs immunsérums car les anticorps sont monospécifiques et de ce fait plus rares et réservés aux laboratoires hautement spécialisés. Théoriquement, c'est la meilleure méthode et les immunisations intra-familiales sont excellentes, mais souvent on assiste à un phénomène d'élargissement de la spécificité et les sérums obtenus donnent des réactions croisées. Le groupage HL-A au préalable de l'immuniseur et de l'immunisé permet de sélectionner les paires donneur-receveur n'ayant qu'une différence antigénique restreinte (69, 167). Les volontaires sont immunisés pendant un an par 14 à 16 transfusions de 80 ml de sang par semaine, avec des périodes de repos de quatre semaines (18), par des homogreffes de peau de 10-15 mm de diamètre sur l'avant-bras (8) ou par des homogreffes cutanées suivies d'injections de leucocytes (166) par voie intraveineuse ou intradermique (95) : par voie intraveineuse, après rejet de la greffe, sont injectés 50 ml de sang contenant une moyenne de 350.10^6 leucocytes et par voie intradermique, 100 à 200.10^6 cellules en quatre injections de 0, 5 ml dans la région deltoïde.

Les transfusions isogroupe ABO-Rhésus entre père et fils donnent surtout des anticorps cytotoxiques et de rares anticorps fixant le complément ; ces anticorps sont de trois types :

- monospécifiques.
- long anticorps couvrant deux ou plus de spécificités.
- anticorps CYNAP (cytotoxicité négative, adsorption positive) pouvant servir comme monospécifiques, mais plus rares.

Critères de monospécificité

La notion de monospécificité est fonction de la technique utilisée. Un même immunsérum peut se comporter comme polyspécifique dans la réaction de lympho-cytotoxicité et comme monospécifique dans la RFCP1. Ce phénomène est dû à la relative hyposensibilité de la RFCP1.

L'évaluation de la monospécificité d'un immunsérum peut être faite par les méthodes d'adsorption-élution : ce sérum est éprouvé sur un ensemble de N individus et il se comportera comme monospécifique si chaque variété cellulaire adsorbe la réactivité de l'immun-sérum vis-à-vis d'elle-même et vis-à-vis de toutes les autres cellules réactives ; l'éluat obtenu à partir de chaque variété cellulaire sensibilisée doit réagir, non seulement avec les cellules ayant servi à l'élution mais avec toutes les autres cellules réactives. Une deuxième méthode plus simple pour évaluer la mono-spécificité d'un immun-sérum consiste à éprouver la réactivité des adsorbats et des éluats sur les cellules de l'immuniseur. La valeur de N nécessaire pour

que de telles études soient concluantes a été discutée (169), on admet que N = 30 donne une sécurité suffisante ; des valeurs de N plus faibles peuvent être acceptées lorsque la fréquence de la spécificité étudiée est faible ($< 0,15$).

III. MATERIEL

Les cellules utilisées

Vingt souches de fibroblastes humains normaux ont été examinées : deux proviennent du "Wistar Institute" de Philadelphie, une du Médical Research Council de Londres, les dix sept autres sont obtenus à partir d'embryons humains et de biopsies de peau.

Nous tenons à exprimer nos remerciements :

- au Dr. JP JACOBS du National Institute for Médical Research de Londres pour la souche MRC-5 (20è passage)

- au Dr. R. LANG, Institut Mérieux de Lyon pour la souche WI-26 (28è passage)

- au Pr A. BOUE, SESEP Chateau de Longchamp. Paris pour les souches n° 4 à 16

- au Dr ML SASPORTES, Laboratoire d'Immuno-Hématologie, Hopital St Louis, Paris - pour les souches n° 17 à 20.

Ces différentes souches nous parviennent dans des flacons et milieux propres à leur laboratoire d'origine. Les cellules de chaque flacon sont détachées par la trypsine puis remises en suspension dans le milieu de Eagle additionné d'auréomycine et de 10 % de sérum de veau inactivé. La suspension obtenue est répartie dans deux nouveaux flacons de verre neutre ayant une surface de culture de 44 cm^2 (genre"milk")

ou en plastique (genre "Falcon") avec une surface de culture de 75 cm^2.

Les cellules, avec le milieu de croissance indiqué, sont incubées à 37°C ; le milieu est changé le lendemain et la récolte peut se faire aux 3è ou 4è jour de culture.

Les sérums utilisés

Les "empreintes" par la RFC des vingt souches de fibroblastes ont été prises grâce aux sérums du tableau 2. Nous avons disposé des volumes variant entre cent et six cents µl suivant la rareté du sérum.

Arrivés dans notre laboratoire, ces immunsérums ont été décongelés et répartis en très petits volumes de 5 et 15 µl dans des micro-tubes "rhésus" en plastique. Une fois bouchés et étiquetés, ces divers échantillons sont conservés à -65°C (congélateur "Revco") et ne seront décongelés qu'une deuxième fois au moment de l'emploi.

Suivant les besoins, les volumes de sérums répartis dans les microtubes ont été calculés de façon à procurer des quantités suffisantes, après dilution directe dans les tubes, pour obtenir trente à cinquante plaques de groupage.

TABLEAU 2

1er locus			2è locus		
Spécificités	Sérums	Quantité (µl) par cupule	Spécificités	Sérums	Quantité (µl) par cupule
1	Revi	0,080	5	Berl	0,020
1	Parn	0,020	5	Pool	0,200
1	Brig	0,020	7	Rama	0,040
2	Alar	0,080	Da 6	Dubr	0,200
2	Cadi	0,080	Da 6	Moui	0,020
2	Thir	0,040	W21	Duss	0,400
3	Fisc	0,066	W21	Marg	0,020
9	Dupo	0,200	W15	Lind	0,028
9	Cham	0,200	W14+10	Gabi	0,400
9	Gail	0,040	W10	Dima	0,020
10	Gran	0,200			
11+17	Depi	0,025			
1 +11	Pari	0,066			
28 + 2	Lema	0,020			

Les spécificités en chiffres non précédés de lettre = antigènes HL-A de la nomenclature officielle .

Les sérums utilisés pour le groupage HL-A des souches étudiées sont ceux réservés à la RFCP1 et à la lymphocytotoxicité dans le service du Pr DAUSSET. Ces sérums sont représentés aux tableaux 3 et 4 et sont distribués préa-

TABLEAU 3

Sérums utilisés pour le groupage par la RFC

Spécificités	Sérums	Quantité (µl) par cupule	Spécificités	Sérums	Quantité (µl) par cupule
1	Arha	0,200	5	Goud	0,080
1	Revi	0,080	5	Oliv	0,200
W18	Idir	0,200	5	Lore	0,200
W18	E 294	0,080	7	Guer	0,040
2	Cuth	0,080	7 (+1,+8)	Prau	0,133
2	Guer	0,080	7	Sent	0,250
3	Fisc	0,066	W10	CLB5	0,040
3	A395	0,400	W10	BB Sv.	0,200
3	Bc	0,333	W10+W21	Meur	0,028
9	Lepa	0,040	12+27(+13)	Goue	0,020
9	Baus	0,080	12 (+13)	Alla	0,025
9	Cham	0,200	12	Clod	0,200
10 (+W5)	Marr	0,040	13+W10	Gent	0,008
10	Gran	0,200	13	E 13	0,200
10+W19	Roer	0,040	13	Rois	0,200
11	E249	0,028	Da 6	Grad	0,400
11+17	Depi	0,025	Da 6	Zara	0,020
11	Turn	0,250	Da 6+12	Gall	0,200
28	Chri	0,200	14	Kerd	0,200
28 (+2)	Rutl	0,250	14	Sche	0,133
28 + 2	Viln	0,040	14	E 14	0,200
W29+W5	Bert	0,333	Da19	Schu	0,200
W29	E D22	0,200	W15	Beau	0,400
W29	Lene	0,333	W15	Ugue	0,013
Da25	Geor	0,050	W21	Marg	0,020
W32	P53	0,400	W21	Rago	0,080
17	Pat	0,133	W22	Jost	0,400
27 + 9	Aubr	0,100	W5+W22	Adle	0,050
27	Mars	0,013	W5	E W5	0,400
8	Van R	0,500	W5(+W15)	Arno	0,133

Les spécificités en chiffres non précédés de lettre = antigènes HL-A de la nomenclature officielle.

(+...) indique les extra-anticorps de plus faible réactivité contenus dans le sérum

TABLEAU 4

Sérums cytotoxiques utilisés (batteries SL27 & SL28)

Spécificités	Sérums	Quantité (µl) par cupule	Spécificités	Sérums	Quantité (µl) par cupule
1 + 17	Bonn	1,00	12+W21	Leco	1,00
1 + 17	5186	0,33	12	Lafe	1,00
2	Piqu	1,00	13	Dauz	0,50
2	Hisl	1,00	13	Van I	5,00
2+28(+9)	Yau	0,12	13+W10	Heit	1,00
2+28	Noke	1,00	14	Fer34/9	1,00
11+3	Bimb	1,00	14	Ball	0,50
11+3	Roye	1,00	14 + 8	Amou	0,50
11+ 1	Toig	3,00	W5 (+5)	Caba	0,16
11+ 1	Tord	0,50	W5	Quin	1,00
11	Noel	1,00	W5	Ribe	1,00
3	Havr	1,00	W15	Ther	0,12
3	Racc	0,50	W15	X549/68	0,33
9	Cast	2,00	W21	Ches	1,00
9	letr	2,00	W21	Hall	0,33
10	Lafo	2,00	W21(+1+12)	Arfi	0,50
10	Loui	2,00	W18	Laju	1,00
W29	Bert	3,00	W18	Mout	1,00
W29	Youg	0,50	W22	Houo	1,00
Da25	Merl	1,00	W22	Weeg	2,00
Da25(+2)	Poum	1,00	W22+ 7	Ghou	1,00
5	Dubo	2,00	W10(+7)	Deri	1,00
5	Plat	0,16	W10+ 7	Lech	0,12
5	Fril	1,00	27	Thom	1,00
7	Cutt	1,00	27	108C	0,33
7+ 28	Mart	1,00	27+13	Fell	1,00
8	5183	0,25	17	9594 71	0,33
8	Will	1,00	17	Akkr	0,12
12	Ranc	3,00	W32+W18	Brie	1,00

Les spécificités en chiffres non précédés de lettre = antigènes HL-A de la nomenclature officielle.

(+...) indique les extra-anticorps de plus faible réactivité contenus dans le sérum.

lablement dans les plaques de groupage pour plaquettes et pour lymphocytes avant transplantation d'organes.

Dilution des sérums

Les sérums inactivés sont employés à des dilutions allant de 1/5 à 1/100 pour la RFC et 1/1 à 1/8 pour la réaction de cytotoxicité. Les dilutions sont faites avec précision (car leur spécificité en dépend) en solution isotonique en Na Cl additionnée ou non de 0,1 % de Na N3.

Pour égaliser les différentes concentrations en protéines sériques, les basses dilutions jusqu'à 1/10 sont faites en soluté physiologique et les dilutions supérieures s'effectuent en ce même diluant additionné de 10 % de sérum humain inactivé de groupe AB.

Les solutions de Hanks, tampon de Mayer et tampon phosphate isotonique (PBS) essayés comme diluants ne nous ont pas donné de résultats constants car ils augmentent l'anticomplémentarité des sérums après conservation à -20°C ou à -65°C.

Pour la RFC, les immunsérums répartis en plaques de groupage, à 2 µl de la dilution spécifique, doivent être conservés à -20°C ou -65°C. De cette façon, les plaques sont utilisables pendant un ou deux mois. Les mêmes observations

sont applicables aux plaques de groupage par cytotoxicité ; dans cette méthode, quelques sérums faibles ont dûs être utilisés purs à des volumes jusqu'à 5 µl

Le complément humain

Utilisé pour la RFC, il nous est fourni par le Centre National de la Transfusion Sanguine grâce à l'amabilité du Professeur JP SOULIER et de Madame PROU que nous tenons ici à remercier.

C'est un mélange de cinq sérums de donneurs de sang de groupe AB non immunisés. Le sang est prélevé à jeun sans anticoagulant et laissé à la température du laboratoire pendant 60 minutes puis deux heures à 4°C pour permettre la formation du caillot. Après centrifugation à 4°C pendant 20 minutes à 2500 G ($G = 1118 \times R \times (\text{tours/min.})^2 \times 10^{-8}$, R = rayon moyen de rotation en cm des pots centrifugés en position horizontale) on recueille le sérum qui est réparti ensuite en parties aliquotes de 0, 5 ml dans des micro-tubes en plastique bouchés puis conservés à -65° C.

Le complément est décongelé une seule fois et rapidement au bain-marie à 37°C, puis maintenu dans un bain de glace fondante pour dilution. Le diluant est du tampon de Mayer à pH 7, 3 que nous préparons au moment de l'emploi à partir d'une solution concentrée cinq fois. Cette solution mère est obtenue avec :

1.	NaCl	85 g
	Diéthylmalonylurée sodée	3,75 g
	Eau distillée	1400 ml
2.	Diéthylmalonylurée	5,75 g
	Eau distillée chaude	500 ml
3.	$CaCl_2, 2H_2O$	4,411 g
	$MgCl_2, 6H_2O$	20,331 g
	Eau distillée qsp	100 ml

On mélange 1 et 2, on refroidit et ajoute 5 ml de la solution stock n° 3 puis on complète à 2000 ml avec de l'eau distillée. La solution obtenue est ajustée à pH 7, 3 et conservée à 4°C.

Le complément de lapin

Ce produit est utilisé dans la réaction de cytotoxicité ; pour en obtenir 200 ml, cinq lapins normaux sont saignés par ponction cardiaque ou section carotidienne. Le sang de ces lapins, prélevé en dix minutes au maximum, est laissé à l'étuve à 37°C pendant une heure. Après rétraction, on sectionne le caillot et on filtre sur gaze ; le sérum est recueilli par centrifugation à 2000 G pendant 15 minutes à 4°C, puis maintenu à cette température pendant toutes les opérations ultérieures.

Les anticorps naturels anti-homme du sérum de lapin sont adsorbés sur des globules rouges humains préparés de la manière suivante : le sang de trois donneurs normaux, deux de groupe A (antigène Forssman) et un de groupe B, est prélevé sur solution ACD ; les globules sont lavés quatre fois en soluté physiologique, les culots érythrocytaires sont mélangés lors du dernier lavage et ensuite centrifugés à 2000 G pendant dix minutes pour éliminer le maximum de liquide de lavage.

Le mélange de sérums de lapin est adsorbé avec un volume égal de culot globulaire à 0°C pendant une heure avec agitation toutes les dix minutes. Après une nouvelle centrifugation à 0°C pendant dix minutes à 2000 G, le sérum adsorbé est recueilli, réparti en parties aliquotes de petits volumes et conservé à -65°C.

Chaque lot de complément est titré avec un immunsérum (anticorps polyspécifique) connu pour être cytotoxique avec toutes les variétés cellulaires. L'absence de cytotoxicité propre du sérum de lapin frais et du sérum inactivé est vérifiée.

Hématies de mouton sensibilisés

Les érythrocytes de mouton, existant dans le commerce,

nous parviennent régulièrement toutes les semaines. Ils ont l'avantage d'être contrôlés au départ par leur producteur.

Avant l'emploi, les globules sont lavés en soluté physiologique trois fois puis remis en suspension dans le tampon de Mayer, fraîchement préparé, à la concentration de 400.000/µl. L'ajustement du nombre des globules à ce chiffre est très important afin d'avoir des résultats reproductibles et comparables.

La sensibilisation des érythrocytes s'effectue en mélangeant la suspension globulaire à un volume égal d'hémolysine de lapin anti hématies de mouton diluée en tampon de Mayer (sérum hémolytique de l'Institut Pasteur utilisé à 20 unités hémolytiques par ml) puis en incubant le mélange au bain-marie à 37°C pendant trente minutes. Les globules rouges sensibilisés ainsi obtenus sont conservés à 4°C pour la journée.

Solution de bleu trypan

Ce réactif sert à colorer les cellules mortes dans la réaction de cytotoxicité ; il est préparé par mélange extemporané de trois volumes de solution aqueuse de bleu

à 2 o/oo (BDH Ldt Laboratorn Chemical Group, Angleterre) et d'un volume de solution de Hanks hypertonique (solution de Hanks normale à laquelle sont ajoutés 2,55 g de NaCl pour 100 ml)

Le matériel divers

Les microtechniques employées dans ce travail exigent un matériel spécial :

Les plaques en polystyrène utilisées sont des plaques "Microtest 3034 Falcon" stériles, traitées, de base 55 x 80 mm et comprenant six rangées de dix cupules. Des plaques identiques (Greiner, 67-Bischwiller) non traitées, non stériles, peuvent être réservées pour la RFC mais sont impropres à la réaction de cytotoxicité.

Toutes les cupules sont recouvertes de 4 ml d'huile de paraffine de viscosité Saybolt 335-350 (Merck Art 7160). Les réactifs sont distribués dans les cupules à l'aide de micro-seringues Hamilton (Touzart - Matignon, 3, rue Amyot Paris 5e) montées sur un dispositif permettant de délivrer le cinquantième du volume de la seringue.

Les plaques sont agitées par vibrations sur un agitateur à grand plateau de caoutchouc (type Cyclo-mixer A-4000 de Clay

Adams) pouvant atteindre 3000 tours/min.

L'incubation se fait dans une étuve à 37°C et les plaques sont centrifugées, lors de la RFC, dans des portoirs Microtiter (Cooke Engineering C°, Alexandria, Va) ou dans des portoirs spéciaux fabriqués par la maison Jouan pour ses centrifugeuses.

La lecture des plaques nécessite une source de lumière diffuse, homogène et d'intensité suffisante (genre rhésuscope ou négatoscope) pour la RFC. Il suffit d'un microscope ordinaire ou mieux microscope inversé (grossissement x 150 ou 250) pour la réaction de cytotoxicité.

IV. METHODES DE FIXATION DU COMPLEMENT SUR PLAQUETTES ET DE LYMPHOCYTOTOXICITE

Les possibilités de la réaction de fixation du complément sur plaquettes (RFC P1) pour la définition des antigènes HL-A des deux loci ont été publiées en même temps qu'une micro-technique standardisée (23). Il faut cependant savoir que la RFC donne parfois des fausses réactions négatives attribuables dans certains cas à un mauvais choix de la dilution de l'immunsérum ; c'est le cas pour HL-A2, HL-A3 ou HL-A1, HL-A12 : ces derniers sont par contre bien révélés par la réaction de lymphocytotoxicité (LyCT). En revanche, la RFC P1 donne une meilleure définition de l'antigène HL-A 28.

Les immunsérums utilisés dans la RFC P1 proviennent surtout de polytransfusés ou d'immunisations plannifiées. Les anticorps anti-HL-A fixant le complément sont des IgG, 7S (146) qui, liés aux antigènes solubles HL-A, ne fixent plus le complément (42).

Le complément est d'origine humaine (24) car le sérum de cobaye, tout en étant très riche en unités hémolytiques, fournit un produit ayant certains inconvénients (148) : sensibilité plus grande à un inhibiteur de la fixation du complément ou à l'activité anticomplémentaire de certains immunsérums.

L'avantage de la RFC P1 consiste en la possibilité de conserver les plaquettes sans altérations de leurs antigènes pendant 6-12 mois en milieu salin à 4°C (constitution de "panels" de cellules connues) ou plus longtemps encore à -70°C (119). C'est l'attrait qui nous a fait choisir cette méthode pour les "empreintes" des souches de fibroblastes. De plus, la RFC permet de mettre en évidence les réactions croisées entre antigènes et même de les quantifier (détermination d'homozygotisme ou d'hétérozygotisme).

Quant à la LyCT, la méthode fut utilisée chez l'homme en 1964 par Walford (166) et par Terasaki (153) ; la macrométhode (2, 34, 51, 166, 167) a cédé le pas à la microméthode (104, 156, 69) : la suspension ajustée en lymphocytes est incubée pendant des temps divers, suivant la variante utilisée (170), avec l'anticorps en présence de complément humain ou animal. Le complément de lapin est le plus actif, mais pour éviter les anticorps anti-Forssman et l'effet cytotoxique propre du sérum de lapin (60, 154), celui-ci est adsorbé sur des cellules de cultures ou sur cellules du sang périphérique (59)

La réaction de cytotoxicité est maintenant appliquée par la plupart des auteurs à la détermination des antigènes HL-A des fibroblastes (54, 158). Son principal avantage réside dans le fait qu'elle dispose de nombreux immunsérums provenant de multipares.

Technique de RFC P1

Titrage du complément humain

Son principe est classique : incubation puis addition de globules rouges sensibilisés aux dilutions successives de complément ; on détermine ensuite l'unité hémolytique choisie.

Dans une série de 15 tubes numérotés et maintenus dans un bain de glace fondante, on fait des dilutions rapprochées, en tampon de Mayer, du complément venant d'être rapidement décongelé : 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25... 1/75.

On distribue ensuite dans chaque cupule d'une plaque de microtitration recouverte de 4 ml d'huile de paraffine visqueuse :

Tampon de Mayer..... 4 µl
Dilution du complément.. 2 µl

Après 60 minutes d'incubation dans une étuve réglée à 37 ± 0,2°C, on ajoute dans chaque cupule 2 µl de la suspension à 200.000/ µl de globules rouges de mouton sensibilisés.

La plaque est maintenue fermement en contact avec le plateau en caoutchouc de l'agitateur à vibrations pendant 15 à 30 secondes pour bien mélanger les divers réactifs, puis elle

est remise dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes avec agitation au bout de 5 et 15 minutes.

Après incubation, la plaque est mise dans un portoir spécial et centrifugée à 200 G pendant une à deux minutes. Si le Laboratoire ne dispose pas de centrifugeuse avec portoirs spéciaux, la lecture peut être faite après un séjour d'une heure des plaques à 4°C.

L'intensité de la réaction s'observe en posant la plaque, couvercle enlevé, sur une plaque d'opaline éclairée par le dessous. L'hémolyse est évaluée à l'oeil nu d'après la couleur du surnageant et la taille du culot globulaire dans les cupules. Avec une certaine pratique, chaque technicien arrive à obtenir des résultats gradués et toujours comparables aux lectures faites par une autre personne entrainée.

L'échelle adoptée pour noter les résultats est fonction de l'hémolyse :

% d'hémolyse :	0 à 20	40	60	80	90	100
valeur :	4	3	2	1	0.	0

Dans ce titrage de complément, fait en triple, l'unité hémolytique retenue est celle donnée par la plus haute dilution de complément ayant produit une hémolype complète (H 100). Une concentration deux fois plus forte, contenant donc 2 unités H100, est employée

dans la réaction.

Groupage des plaquettes

La suspension plaquettaire étant ajustée à la concentration de $2.10^6/\mu l$ pour la conservation à 4°C, au moment de l'emploi elle doit être diluée en soluté physiologique nitruré pour avoir une concentration de $5.10^5/\mu l$.

Dans chaque cupule de la plaque de groupage, où les immunsérums ont été préalablement distribués sous un volume de 2 µl de leur dilution spécifique, on ajoute 2 µl de la suspension plaquettaire à $5.10^5/\mu l$. On distribue ensuite dans toutes les cupules 2 µl de complément (dilution contenant 2 unités H100). Au cours de toutes ces manipulations, il est important d'essuyer entre chaque cupule l'extrémité de la seringue. La plaque est ensuite agitée par vibrations pendant 15 à 30 secondes puis laissée pendant une heure dans l'étuve à 37°C.

Après cette incubation, deux µl de globules rouges de mouton sensibilisés (200.000/ µl) sont ajoutés dans chaque cupule. La plaque est agitée de nouveau pour bien mélanger le tout puis elle est incubée pendant 30 minutes à 37°C avec agitation aux 5è et 15è minutes. La lecture se fait comme pour le titrage du complément.

Technique de LyCT

Titrage du complément de lapin

Son but est de vérifier que dans les conditions standard de la réaction, la quantité de complément de lapin est en excès et donc non limitante.

Des quantités croissantes de complément sont ajoutées à un volume constant d'immunsérum de référence inactivé, de suspension cellulaire connue et de solution de Hanks sous un volume final de 12 µl (plaques Microtest Falcon traitées, recouvertes d'huile de paraffine)

N° de réactions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Immunsérum inactivé	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-
Hanks normale	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	-	1	1
Suspension cellulaire	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Incubation 30' à l'étuve à 37° C													
Sérum de lapin frais inactivé	- -	1 -	2 -	3 -	4 -	5 -	6 -	7 -	8 -	9 -	10 -	10 -	- 10
Incubation 60' à 37° C													
Décantation - Bleu Trypan - Lecture après 5'													

Les volumes sont indiqués en µl

Réaction n°1 : témoin immunsérum

" n°12: cytotoxicité de base

" n°13: témoin de l'absence de cytotoxicité du sérum de lapin inactivé

Ce titrage est fait en double et on établit une moyenne :

$$\frac{\text{\% de cytotoxicité observée - \% de cytotoxicité de base}}{200 - \text{\% de cytotoxicité de base}} \times 100 = \%$$

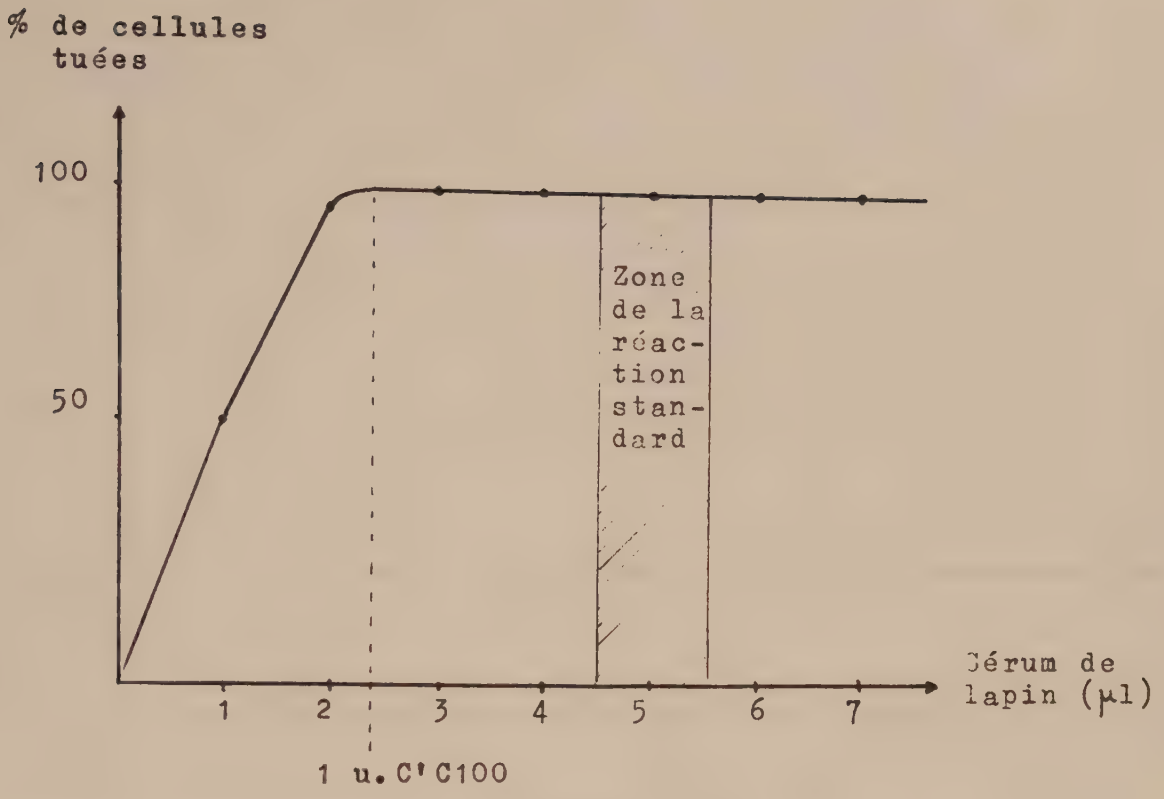
de cytotoxicité.

L'intensité de la réaction est fonction du pourcentage de cellules tuées :

2 - 5 %	cytotoxicité de base
6 - 14	0 (réaction négative)
15 - 20	0. (réaction douteuse)
21 - 30	1
31 - 50	2
51 - 80	3
81 -100	4

Les cellules vivantes, observées au microscope ordinaire (grossissement x 150 ou x 250), sont de taille normale et réfringentes si l'expérimentateur fait varier la mise au point. Les cellules tuées sont colorées par le bleu trypan, ternes et gonflées.

En traçant la courbe de titrage du complément de lapin, d'après les résultats obtenus, on détermine l'unité cytotoxique 100 % (C'C100). La quantité de sérum de lapin utilisée dans la réaction représente environ 2 unités C'C100.



Groupage des lymphocytes

Suivant leur mode de prélèvement, les lymphocytes sont remis en suspension dans leur sérum ou plasma autologue puis ajustés à la concentration de 2000 à 3000/ µl pour le groupage.

Les immunsérums sont distribués préalablement dans les plaques comme pour la RFC P1 et de même ils ont été sélectionnés pour produire des résultats reproductibles et nets (franchement négatif : 0, ou franchement positif : 4).

V. MISE AU POINT DES METHODES SUR FIBROBLASTES

De cette façon, 1 à $1,5.10^6$ cellules sont récupérées par "milk" et 2 à 4.10^6 cellules par flacon "Falcon".

Conservation des suspensions antigéniques

Les expériences de conservation des suspensions de fibroblastes humains en solution isotonique de NaCl nitrurée à -65°C, -20°C ou à 4°C comme pour les thrombocytes n'ont pas été satisfaisantes. Dans les congélateurs à -20°C ou à -65°C, les antigènes HL-A ne se conservent pas intégralement au delà de deux mois et il a été constaté une baisse du titre antigénique d'une dilution environ à chaque décongélation. A 4°C et jusqu'au 7è jour de conservation, les antigènes sont révélés aussi bien que sur les cellules fraîchement préparées ; les résultats deviennent mauvais à partir de 10è-15è jour.

Nous sommes donc arrivés à choisir la basse température de l'azote liquide (63) : la suspension à 2000 fibroblastes par µl est aspirée dans des paillettes en plastique numérotées de 0,25 ml obturées par une poudre polymérisante au contact de l'eau. Les paillettes sont maintenues horizontalement à 20 cm au dessus de la surface de l'azote liquide pendant 20 minutes pour abaisser la température interne, puis pendant 5 minutes presque au niveau de l'azote liquide. Ensuite, les paillettes sont plongées dans les tubes hexagonaux en plastique au sein de l'azote liquide.

Les récipients conservateurs sont du type RCB 60 (Air liquide : 92 - Le Plessis-Robinson) pouvant recevoir un volume de 60 litres, contenir 16.000 paillettes pour une consommation de 5 litres d'azote liquide par jour.

Décongélation des paillettes

Pour les petits volumes de 0,25 ml, cette opération s'effectue en plongeant les paillettes, dès leur sortie du récipient conservateur, dans un bain-marie à 40°C pendant 15 secondes en agitant. Les extrémités des paillettes sont coupées aux ciseaux et la suspension cellulaire recueillie est immédiatement utilisable pour le groupage par RFC.

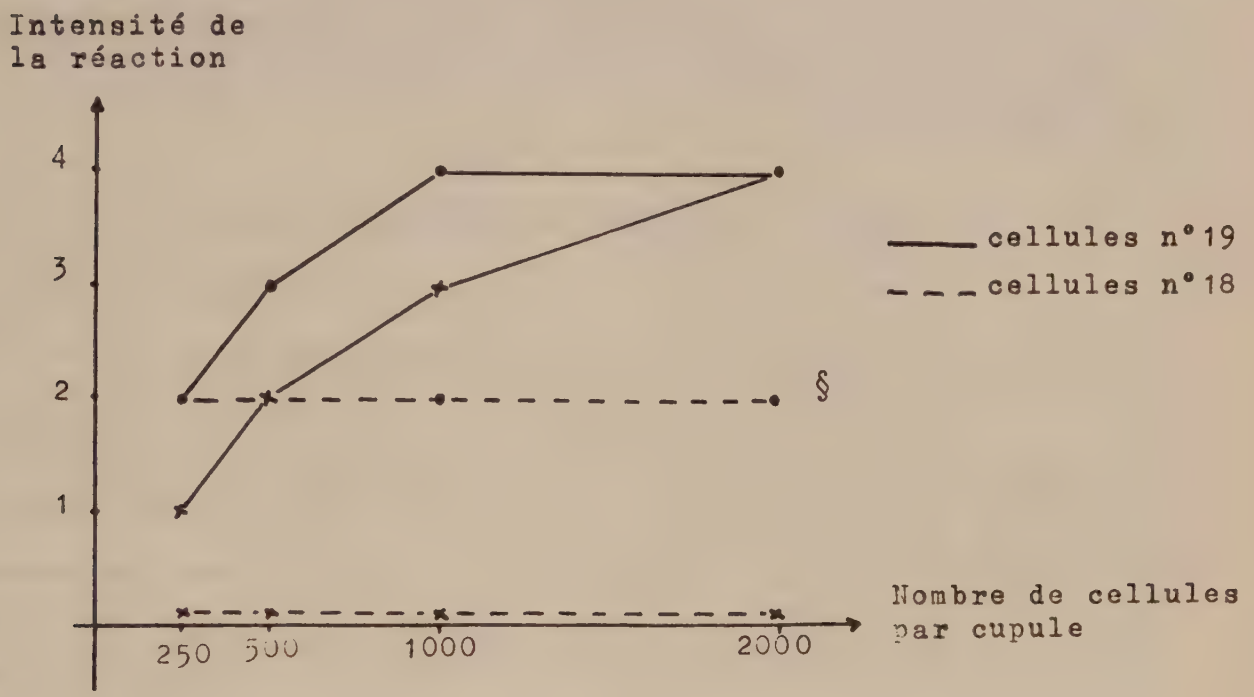
Effet de la concentration en antigène dans la RFC

Les spécificités des immunsérums étant définies sur thrombocytes à des dilutions déterminées, il nous incombe d'adapter au mieux la dose antigénique à celle de l'anticorps.

Avec l'anticorps constant, la quantité de complément fixé est fonction de la concentration en antigène comme vont le montrer les deux expériences suivantes :

A - Les fibroblastes n° 18 (formule antigénique : HL-A1, HL-A7 et HL-A8) et n° 19 (HL-A2, HL-A12, W10) sont éprou-

vés vis-à-vis d'un sérum anti HL-A2 (Herr... au 1/250) à des concentrations variables en cellules. Les résultats sont représentés comme ci-dessous :



• : réaction avec 1,5 u.C'H100

× : " " 2 u.C'H100

§ : la positivité partielle observée est due à la dose trop faible de complément employée dans la réaction .

Il est ainsi important d'utiliser une dose standard de 2 unités C'H100 pour constater que la cellule n° 19, possédant l'antigène HL-A2, est bien positive, alors que la cellule n° 18 est complètement négative.

B - La deuxième expérience a été faite avec des doses plus élevées de cellules n° 17, en présence d'anticorps à concentration fixe et de 2 unités C'H 100. Les résultats diminuent en intensité quand le nombre de cellules dans la réaction augmente :

	Nombre de cellules par cupule	1500	3000	4500	6000
Intensité de la réaction avec	Sérum anti HL-A2(Thir.)	4	3	2	0.
	Sérum anti W21 (Marg.)	2	1	0.	0
	Sérum anti W10 (Dima.)	1	1	0.	0

La souche de fibroblastes utilisée dans cette expérience est homozygote pour la spécificité HL-A2 (présence de cet antigène sur les deux haplotypes). Cette notion est importante pour ce qui va suivre, car deux cellules possédant le même antigène vont répondre différemment suivant la richesse de cet antigène sur leur membrane.

La RFC permet de doser quantitativement l'antigène présent sur la surface cellulaire et de conclure à une plus

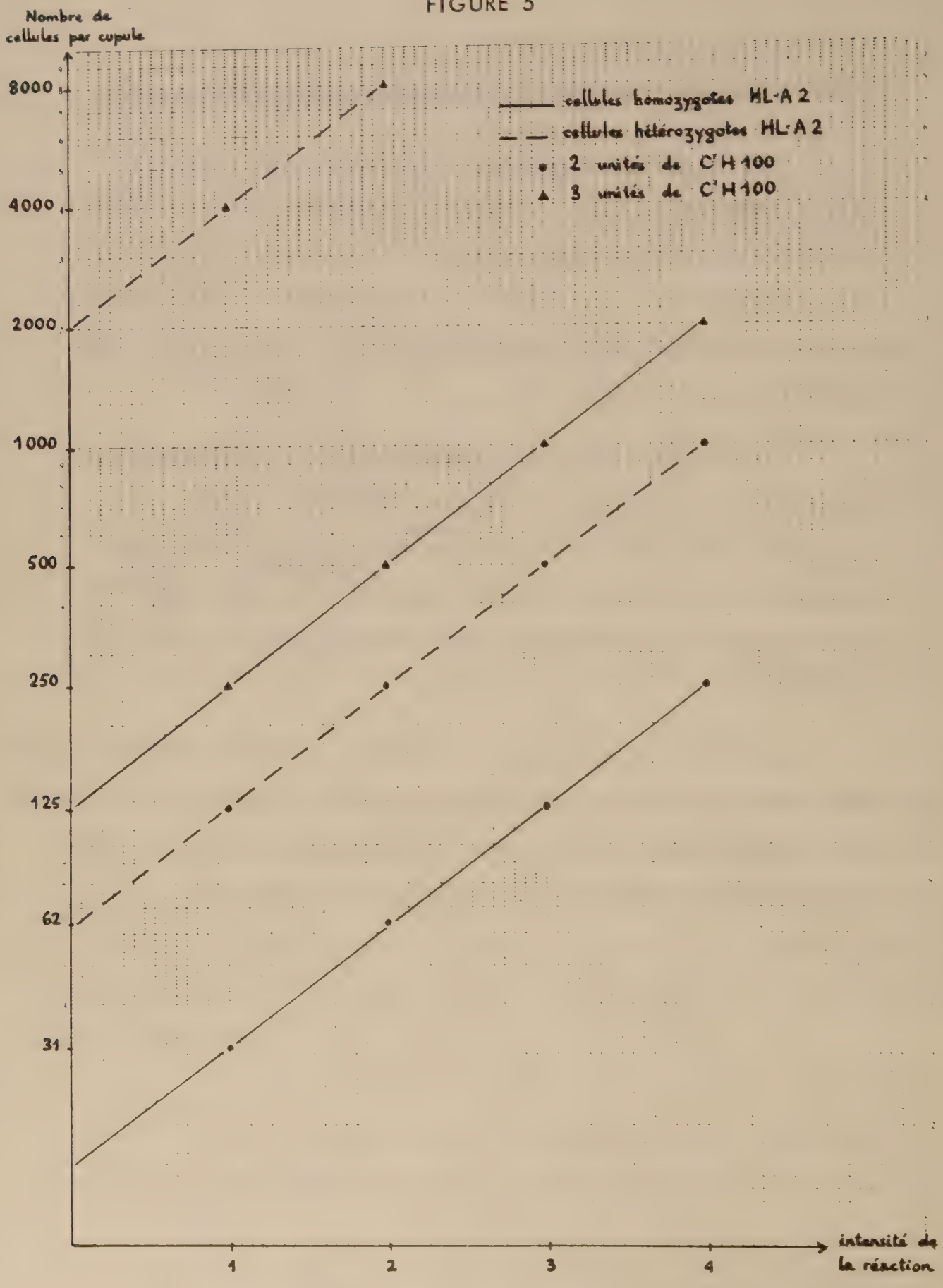
ou moins grande richesse antigénique des cellules étudiées .

L'expérience, qui suit, a été effectuée avec une cellule homozygote pour la spécificité HL-A2 et une cellule hétérozygote pour ce même antigène. L'anticorps est à dose fixe (sérum Herr... au 1/250) et le complément a été employé à 2 et 3 unités C'H100. Les résultats sont représentés dans la figure 5 (page 53) :

Le rapport théorique attendu serait de 2 entre la quantité d'antigène de la cellule homozygote et celle de la cellule hétérozygote, pour une même concentration en cellules. Les résultats observés montrent des rapports de 4 pour la quantité standard de complément et de 16 pour 3 unités C'H 100.

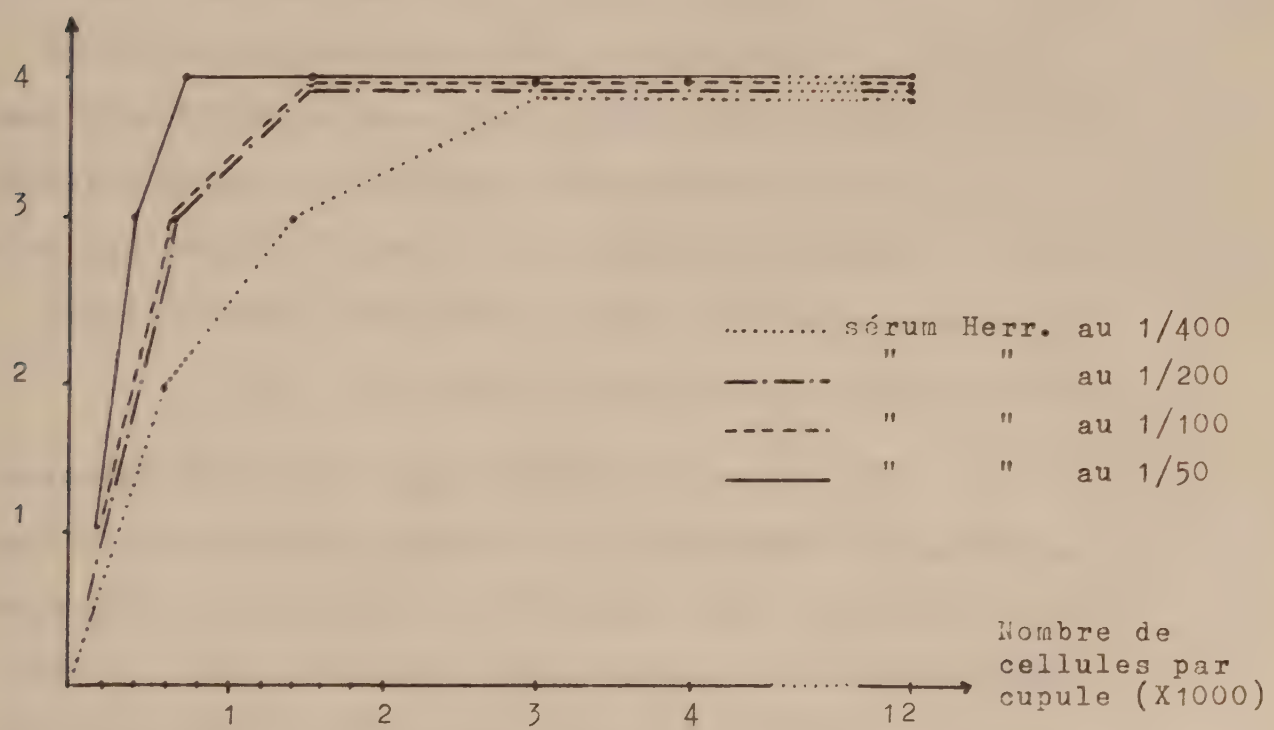
La RFC utilisée dans cette étude permet de conclure qu'aux mêmes concentration cellulaire et dose de complément, avec quantité d'anticorps fixe, la cellule homozygote est plus riche en sites antigéniques que la cellule hétérozygote.

FIGURE 5


Nombre de cellules par cupule
8000
4000
2000
1000
500
250
125
62
31
cellules homozygotes HL-A 2
cellules hétérozygotes HL-A 2
2 unités de C'H 100
3 unités de C'H 100
1
2
3
4
intensité de la réaction

Effet de la concentration en anticorps

A dose antigénique constante, en augmentant la concentration en immunsérum sans atteindre l'anticomplémentarité, la quantité de complément fixée augmente légèrement. Ainsi la souche n° 3 (MRC-5), possédant l'antigène HL-A2, a été éprouvée vis-à-vis d'un sérum anti HL-A2 (Herr...) aux dilutions 1/50, 1/100, 1/200 et 1/400. Ce sérum est spécifique des plaquettes portant l'antigène HL-A2 aux dilutions 1/250 à 1/400.



On voit sur cette courbe, qu'à concentration fixe de 600 cellules par cupule, l'intensité de la réaction varie de 2 à 4 pour une augmentation en immunsérum de huit fois.

En pratique, pour l'antigène HL-A2, la dilution spécifique déterminée sur plaquettes est gardée pour les fibroblastes qui sont utilisés dans la RFC à 4000 cellules par cupule.

L'étude séparée des immunsérums a mis en évidence une différence de réactivité entre les sérums anti HL-A du 1er et du 2e locus : les fibroblastes, ayant par exemple l'antigène HL-A2 au 1er locus et HL-A7 au 2è, donnent bien des réponses franchement positives avec les immunsérums correspondants mais à des doses antigéniques différentes. Il faudra 600 à 2000 cellules par cupule pour un sérum anti HL-A2 alors qu'il nécessitera 3000 à 5000 cellules pour un sérum anti HL-A7.

Au dessous de 600 cellules par cupule de réaction, on risque de tomber dans les fausses réactions négatives et au dessus de 6000 cellules on est proche de l'anticomplémentarité. En pratique, nous utilisons donc des suspensions à 2000 fibroblastes par μl, soit 4000 cellules par réaction dans chaque cupule, avec des concentrations de 4 à 5 fois plus fortes que celles qui sont utilisées

pour les plaquettes pour certains immunsérums du 2è locus. (anti HL-A5 et anti HL-A7)

Effet de la durée et de la température d'incubation

Les composants C'_1, C'_4, et C'_2 du complément sont fixés à froid alors que le C'_3 est très dépendant de la température.

Différents temps et températures d'incubation ont été essayés pour la révélation des antigènes HL-A du 2è locus. La méthode standard utilisée pour la RFC P1 a été décrite. Dans cette technique, la fixation s'effectue en incubant le mélange immunsérum-plaquettes-complément à l'étuve à 37°C pendant 60 minutes. Or, en appliquant ce même protocole aux fibroblastes, nous avons eu de très bons résultats pour les antigènes du 1er locus, alors que ceux du 2è locus ne sont que faiblement révélés ou pas du tout.

OSLER et HEIDELBERGER (100) ont étudié l'effet de la température sur la fixation du complément sur le système albumine d'oeuf de poule et immunsérum de lapin : les unités de complément fixées sont plus nombreuses à froid qu'à 37°C. Nous avons donc essayé de laisser le mélange anticorps-antigène-complément incuber pendant une heure à 37°C puis une nuit à 4°C. Le lendemain, après réchauffe-

ment de la plaque, les globules rouges sensibilisés sont ajoutés au mélange et après incubation de 30 minutes à 37°C avec agitations intermittantes les résultats sont notés. De cette façon, les réactions positives sont devenues plus nettes ; mais comme les réactions très faibles, spécialement pour les antigènes du 2è locus, n'ont pas été améliorées, nous avons gardé pour des raions de commodité le temps de 60 minutes d'incubation à 37°C.

Les facteurs anticomplémentaires

Ce travail est commencé avec des sérums polyspécifiques.

Le milieu de culture surnageant de fibroblastes sains ainsi que celui des cellules WI-38 inoculées d'une souche d'Herpes hominis, après centrifugation à 200 G pendant 5 minutes, sont positifs en fixation du complément avec ces anticorps polyspécifiques.

Le milieu de Eagle donne une réaction douteuse et devient anticomplémentaire si 10 % de sérum de veau lui sont ajoutés. Une solution de 10 % de sérum de veau en soluté physiologique nitruré est de même anticomplémentaire. Par ces observations, l'anticomplémentarité de certaines souches de fibroblastes a pu être surmontée ultérieurement en les maintenant en milieu sans sérum de veau

pendant 24 heures avant la récolte.

Dans la même optique, nous avons recherché l'activité HL-A dans des vaccins préparés ou non sur WI-38, ainsi que dans leur stabilisateur (vaccins rubéoleux, rabique, rougeoleux). Même après ultracentrifugation à 4°C pendant 90 minutes à 165.000 G, les vaccins reconstitués présentaient une réaction positive avec les anticorps polyspécifiques en RFC.

Nous avons recommencé les même expériences avec des sérums anti HL-A relativement monospécifiques, en titrant préalablement le complément en présence de chacun des antigènes et en éprouvant ces derniers, aux concentrations non anticomplémentaires, vis-à-vis d'un sérum anti-HL-A2 et un éluat polyspécifique. Dans ces conditions, nous avons éliminé les positivités antérieures de vaccins sans stabilisateur (rage) et de l'acide L.-glutamique entrant dans la composition du milieu de Eagle à forte concentration, alors que le rôle de l'albumine humaine, séparée par fractionnement et entrant dans la composition du stabilisateur de certains vaccins à 1,50 %, reste indéterminé. En effet, cette albumine nous a donné encore une faible réaction positive, même avec les immunsérums monospécifiques. D'un autre côté,

VAN ROOD et coll. (164) ont décrit une substance sérique inhibitrice d'un sérum anti HL-A2 ; cette substance existerait chez les individus possédant cet antigène et non chez les personnes qui en sont dépourvues. Il pourrait s'agir d'antigène soluble HL-A en faible quantité dans le plasma humain et la possibilité de la présence d'une telle substance dans la fraction albuminique demeure vraisemblable.

Les anticorps polyspécifiques utilisés au début de cette recherche d'anticomplémentarité sont certainement devenus anticomplémentaires par eux-mêmes à force d'être décongelés et recongelés. Les sérums relativement monospécifiques employés en dernier lieu ne sont décongelés que deux fois et les plaques distribuées ne sont pas utilisées au delà de deux mois de conservation à -65°C.

Technique de RFC utilisée pour les fibroblastes

Les 24 immunsérums, dont nous disposons pour cette étude (cf. page 26), sont distribués en double dans la plaque de microtitration : nous avons ainsi une sorte de témoin interne de la reproductibilité de la réaction au niveau de chaque cupule. Pour chaque souche de fibroblastes examinée, sont inclus dans la plaque un témoin-antigène et un témoin du système hémolytique : la dose de cellule mise dans la réaction ne doit pas être anticomplémentaire et la quantité de complément mise en jeu doit produire, dans les

conditions de la réaction, une hémolyse complète des globules rouge de mouton sensibilisés (GRMS).

En dehors des particularités de préparation de la suspension antigénique et de la concentration en immunsérums, la technique est calquée sur celle de la RFC P1.

En résumé, dans chaque cupule de la plaque de microtitration contenant les immunsérums dilués (2 µl) et recouverte de 4 ml d'huile de paraffine visqueuse, on distribue à la micro-seringue successivement :

Suspension cellulaire (2000/ µl)..... 2 µl
Complément (2 unités C'H100)..... 2 µl

- Agitation. Incubation à 37°C, pendant 60 minutes

GRMS..... 2 µl

- Agitation.

Incubation à 37°C, pendant 30 minutes avec agitations intermittentes (p. 39)

- Centrifugation à 200 G, une minute (ou séjour d'une heure à 4°C) Lecture sur plaque d'opaline éclairée.

- Faire un plan de la plaque pour y consigner les résultats des cupules.

Méthode de cytotoxicité

Préparation de la suspension cellulaire

Les conditions de culture et la trypsination du tapis cellulaire sont identiques à celles qui sont utilisées pour la RFC sur fibroblastes.

La suspension cellulaire, en solution de Hanks additionnée de 10 % de sérum humain inactivé de groupe AB, est centrifugée légèrement à 110 G pendant 5 minutes à 18°C ; le culot de fibroblastes est remis en suspension dans la même solution de Hanks contenant du sérum AB ; après numération, la suspension est ajustée à 1300 cellules par μl, concentration utilisée dans la réaction. Le taux de cellules mortes, évalué par numération au bleu trypan, est $\leq 5\ \%$.

Les fibroblastes, ainsi préparés, doivent être utilisés immédiatement pour le groupage HL-A dans les heures qui suivent leur préparation ou conservés dans l'azote liquide.

Conservation de la suspension de fibroblastes vivants

Les mêmes récipients RCB 60, déjà décrits, sont employés ici et le processus d'abaissement de la température interne des paillettes est identique à celui qui est utilisé pour la conservation des suspensions cellulaires en vue de la RFC.

Auparavant, la suspension à 1300 fibroblastes par μl de solution de Hanks contenant 10 % de sérum AB inactivé est refroidie à 4°C et mélangée à un volume égal de solution de DMSO à 20 % en tampon phosphate salin (PBS).

La solution de diméthylsulfoxide est ajoutée goutte à goutte au début du mélange puis rapidement à la fin.

Les fibroblastes ainsi préparés sont conservés dans des paillettes en plastique de 0,5 ml, numérotées et obturées.

Décongélation des paillettes

L'opération se fait en les plongeant, dès leur sortie de l'azote liquide, dans un bain-marie à 40°C pendant 30 secondes tout en agitant. Ensuite, on ajoute au contenu des paillettes décongelées, goutte à goutte tout en agitant, 2 ml de Plasmagel (Plasmagel désodé, glucosé : Laboratoire Roger Bellon 159, avenue du Roule 92 - Neuilly-sur-seine) dilué au demi en soluté physiologique ou encore d'un mélange à parties égales de plasmagel, de soluté physiologique et de sérum humain de groupe AB (non cytotoxique)

La suspension cellulaire obtenue est centrifugée à 110 G pendant 5 minutes à 18°C ; après élimination du surnageant, le culot de fibroblastes est repris dans 0,15 ml de solution de Hanks finale - Après numération des cellules mortes au Bleu trypan ($N \leq 10-12\ \%$), la suspension est ajustée à 1300 fibroblastes par µl en solution de Hanks.

Doses d'anticorps utilisées

Les plaques de groupage, utilisées pour treize souches de fibroblastes des 20 souches étudiées, sont celles qui sont employées dans le Service du Pr. DAUSSET pour la

réaction de lympho-cytotoxicité. Les immunsérums ont été décrits page 28, avec les quantités contenues dans les cupules.

La plaque de groupage possède un témoin négatif constitué par du sérum AB non cytotoxique et un témoin positif qui est un immunsérum connu pour être polyspécifique et réagissant avec toutes les variétés de cellules.

Les résultats ont montré qu'un petit nombre de sérums de la plaque de groupage est cytotoxique pour tous les fibroblastes examinés, alors qu'il ne l'est pas pour les lymphocytes pour lesquels les immunsérums en cause ont été choisis. Cet inconvénient est mineur, car chaque spécificité est reconnue par plusieurs sérums et pour la détermination des antigènes HL-A portés par la cellule, nous n'avons pas tenu compte des résultats obtenus par les sérums positifs avec toutes les souches de fibroblastes.

Dose de cellules utilisée

Les immunsérums de la plaque de groupage par cytotoxicité ont été sélectionnés et dosés pour 2000 à 3000 lymphocytes par cupule. En employant 2 unités C'C 100, les fibroblastes ont été éprouvés vis-à-vis des immunsérums de cette plaque de groupage, à différentes concentrations et

suivant la technique décrite plus loin.

Des résultats franchement négatifs ou positifs ont été obtenus avec des concentrations cellulaires de 1200-1400 par cupule.

Durées et températures d'incubation

La technique de LyCT a été appliquée intégralement aux fibroblastes au départ. Mais ces cellules, étant plus fragiles que les lymphocytes, étaient toutes tuées après 90 minutes d'incubation à 37°C avec les doses d'immunsérums et de complément de lapin identiques à celles qui sont utilisées pour les lymphocytes.

Le titrage du complément de lapin (page 42) a été repris avec incubation du mélange antigène-anticorps-complément à différentes températures et durées. L'incubation retenue pour la technique définitive dure 60 minutes à la température du Laboratoire.

Technique de cytotoxicité utilisée pour les fibroblastes

Les détails pratiques ont été exposés pour la LyCT (pages 42-45) ; exceptées les particularités concernant l'utilisation des immunsérums non cytotoxiques pour fibroblastes et le mode d'incubation, la technique reste la même.

Dans chaque cupule de la plaque de groupage recouverte d'huile de paraffine, on distribue :

Sérum anti HL-A..... 0,12 à 5 µl
Suspension de fibroblastes (1300/µl) 1 µl

Incubation à l'étuve à 37°C pendant 30 minutes

Complément de lapin adsorbé..... 5 µl
(2 unités C'C 100)

Incubation à la température du Laboratoire pendant 60 minutes

Décantation du surnageant des cupules

Bleu trypan..... 1 µl

Lecture après 5 minutes, sans attendre plus d'une heure.

VI. RESULTATS

Les vingt souches de fibroblastes étudiées ont été toutes éprouvées par la RFC ; treize d'entre elles l'ont été également par la réaction de cytotoxicité .

L'ensemble des intensités de la réaction observées sur une plaque de groupage , pour une même souche cellulaire , tant par la RFC que par la cytotoxicité , constitue "l'empreinte" de la souche étudiée .

Les tableaux 6 à 10 représentent les " empreintes " des vingt souches de fibroblastes obtenues par la RFC avec les immunsérums décrits à la page 26. Nous allons revenir sur ces figures pour le classement des souches cellulaires par leur ressemblance .

Le tableau 11 donne ensuite les spécificités HL-A détectées sur les cellules par les deux méthodes avec les concordances et les discordances .

TABLEAU 6

VI – 38

1	4	0.	1	0.	0.	1
2	2	4	4	×	1	×
3	0.	0	2	1	0.	3
4	×	1	0.	0	0.	1
5	0.	0.	1	0	0	0
6	4	0.	1	0.	0.	1
7	2	4	4	×	1	×
8	0.	0	2	1	0.	3
9	×	1	0.	0.	0.	1
10	0.	0.	1	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

VI – 26

1	4	3	3	0	3	1
2	1	3	4	×	1	×
3	0.	0.	0.	0.	0	1
4	×	2	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0
6	4	3	3	0	4	1
7	1	4	4	×	1	×
8	0	0	1	0.	0	0.
9	×	2	0	0	0.	0
10	0	1	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

NRC – 5

1	4	0	0	0	0	0
2	2	4	3	×	0.	×
3	0	0	2	0	0	0
4	×	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0
6	4	0	0	0	0	0
7	2	4	3	×	0.	×
8	0	0	2	0	0	0
9	×	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

4

1	4	0.	1	0	0.	0
2	0.	0	1	×	0.	×
3	4	0	2	0	0	0
4	×	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0
6	4	0.	2	0	0.	0
7	0.	0	1	×	0.	×
8	3	0	2	0	0	0
9	×	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

TABLEAU 7

5

1	4	0.	1	0	0.	0
2	1	3	4	×	0.	×
3	3	0	3	0.	1	3
4	×	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	4	0.	1	0	0.	0
7	1	4	4	×	0.	×
8	3	0	3	0	0.	3
9	×	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

6

1	4	0.	0	4	3	0.
2	0.	0	0	×	0	×
3	0	0	3	0	0	0
4	×	0.	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	4	0.	0.	4	2	0.
7	0	0	0	×	0	×
8	0	0	3	0	0	0
9	×	0.	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

7

1	4	3	3	3	4	4
2	1	0.	0.	×	1	×
3	2	0	3	0.	0	1
4	×	0.	0	0.	1	0
5	0.	2	0	0	0	0
6	4	4	3	3	4	4
7	1	0.	0.	×	1	×
8	1	0	4	0.	0	2
9	×	1	0	1	1	0
10	0	1	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

8

1	4	0	0.	0	0.	0
2	0.	0	0.	×	0.	×
3	0.	3	4	2	0	0.
4	×	1	0	0	0.	2
5	4	1	0	0	0	0
6	4	0	0.	0	0.	0
7	0	0	0	×	0	×
8	0	2	4	1	0	0.
9	×	0.	0	0	0	2
10	4	0.	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

TABLEAU 8

9

	A	B	C	D	E	F
1	4	4	4	0.	4	4
2	3	1	2	×	2	×
3	4	0	3	1	0.	4
4	×	2	0	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0
6	4	4	4	0	4	4
7	2	0.	2	×	1	×
8	4	0	3	1	0.	4
9	×	1	0	0.	1	0.
10	0.	0.	0	0	0	0

10

	A	B	C	D	E	F
1	3	0	0	0	0	0
2	0.	1	1	×	0	×
3	0	0	3	0	0	0
4	×	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	3	0	0	0	0	0
7	0.	1	1	×	0	×
8	0	0	3	0	0	0
9	×	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

11

	A	B	C	D	E	F
1	4	1	1	0	1	4
2	0.	0	0	×	0	×
3	0.	0	3	0	0	0.
4	×	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	4	1	1	0	1	4
7	0.	0	0	×	0	×
8	0	0	3	0	0	0
9	×	0.	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

12

	A	B	C	D	E	F
1	4	0.	1	0	1	0.
2	2	1	2	×	2	×
3	1	3	4	4	1	2
4	×	3	2	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0
6	4	1	1	0	1	0
7	2	1	2	×	2	×
8	1	3	4	4	1	2
9	×	4	1	1	1	2
10	1	2	0	0	0	0

TABLEAU 9

13

1	4	0.	0.	0.	0.	0.
2	0.	2	2	×	0.	×
3	0	0	3	3	0	0.
4	×	0	0	0	0.	0.
5	0	0	0	0	0	0
6	4	0.	0.	0.	0.	0
7	0.	2	2	×	0.	×
8	0	0	3	3	0	0
9	×	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

14

1	4	0	2	0	1	0
2	3	1	3	×	2	×
3	1	0	4	4	2	4
4	×	2	1	2	2	0
5	2	0	0	0	0	0
6	4	0	2	0	1	0
7	4	1	4	×	2	×
8	1	0	4	4	1	4
9	×	2	0.	1	2	0
10	2	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

15

1	4	0.	3	0	0.	0
2	0	0	0	×	0	×
3	3	0	2	0	0	0
4	×	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	4	0.	3	0	1	0
7	0	0	0	×	0.	×
8	3	0	2	0	0	0
9	×	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

16

1	4	1	3	1	2	1
2	3	4	4	×	4	×
3	1	0	3	3	1	3
4	×	1	1	1	1	0
5	0	0	0	0	0	0
6	4	1	2	2	1	2
7	4	4	4	×	4	×
8	1	0	4	3	1	4
9	×	1	1	1	2	0
10	0	0	0	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

TABLEAU 10

17

	A	B	C	D	E	F
1	3	0	0.	0	0	0
2	1	4	3	×	0.	×
3	0	0	0	0	0	1
4	×	0	0	0	4	0
5	0	1	0	0	0	0
6	4	0.	0.	0	0	0
7	1	4	3	×	0.	×
8	0	0	0	0	0	1
9	×	0	0	0	4	0
10	0	1	0	0	0	0

18

	A	B	C	D	E	F
1	4	4	4	0	4	0.
2	0.	0	0	×	0	×
3	0	0	0	0.	0	0.
4	×	0.	0	0.	0.	0
5	1	0	0	0	0	0
6	4	4	4	0	4	0.
7	0.	0	0.	×	0	×
8	0	0	0	0.	0	0.
9	×	0.	0	0	0.	0
10	1	0	0	0	0	0

19

	A	B	C	D	E	F
1	4	0.	1	0	0.	0
2	1	4	4	×	0.	×
3	0	0	0	0.	1	3
4	×	0.	0	0	0.	0.
5	0	1	0	0	0	0
6	4	0.	0.	0	0.	0
7	1	4	3	×	0.	×
8	0	0	0	0	1	3
9	×	0.	0	0	0	0.
10	0	1	0	0	0	0

20

	A	B	C	D	E	F
1	4	4	4	0	4	1
2	1	4	4	×	0.	×
3	0.	0	0.	0.	4	4
4	×	0.	0	0.	0	0.
5	0.	0.	0	0	0	0
6	4	4	4	0	4	1
7	1	4	4	×	0.	×
8	0	0	0.	0.	4	4
9	×	0.	0	0.	0.	0.
10	0	0.	0	0	0	0

TABLEAU 11

Cellules n°	SPECIFICITES HL-A																	
	1	2	3	9	10	11	28	5	7	8	12	Da 6 °	W 5	W 15	W 21	W 10	W 14
1 (WI-38)	−/−	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/+	−/−	−/+	−/−	+/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−
2 (WI-26)	+/+	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/+	−/−	−/n	−/−	−/−	−/−	−/+	−/−
3(MRC-5)	−/−	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	+/+	−/−	−/−	+/n	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−
4	−/−	−/−	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	n/+	n/−	−/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−
5	−/−	+/+	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/+	−/−	n/−	n/−	+/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/+
6	−/−	−/−	−/−	−/−	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	n/−	n/−	−/n	−/−	−/−	−/(+)	−/−	−/−
7	+/n	−/n	−/n	−/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	n/n	n/n	−/n	n/n	−/n	−/n	(+)/n	−/n
8	−/−	−/−	−/+	+/−	+/+	−/−	−/−	+/+	+/+	n/−	n/−	+/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−
9	+/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	−/n	(+)/n	−/n	n/n	n/n	+/n	n/n	−/n	−/n	−/n	−/n
10	−/−	−/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	n/−	n/−	−/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−
11	−/n	−/n	−/n	−/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	n/n	n/n	−/n	n/n	−/n	−/n	−/n	−/n
12	−/−	−/−	−/−	+/+	−/−	−/−	+/+	+/+	−/−	n/−	n/(+)	+/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−
13	−/n	(+)/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	−/n	−/n	n/n	n/n	−/n	n/n	−/n	−/n	−/n	−/n
14	−/n	+/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	(+)/n	(+)/n	n/n	n/n	+/n	n/n	−/n	−/n	−/n	−/n
15	(+)/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	−/n	−/n	−/n	n/n	n/n	−/n	n/n	−/n	−/n	−/n	−/n
16	−/n	+/n	−/n	+/n	−/n	−/n	−/n	−/n	−/n	n/n	n/n	+/n	n/n	−/n	−/n	−/n	−/n
17	−/−	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	+/n	−/−	−/−	+/+	+/+	−/−
18	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/+	−/+	−/−	−/n	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−
19	−/−	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	+/−	−/n	−/−	−/−	−/−	+/+	−/−
20	+/+	+/+	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/−	−/+	−/−	+/n	−/−	−/+	−/−	−/−	−/−

+/− : positif en RFC, négatif en cytotoxicité

° : pas de sérum anti-Da6 en cytotoxicité

n : non déterminé

(+) : réaction faible

Classification des cellules

Notre étude consiste à examiner les cellules et à essayer de dire si telle souche de fibroblastes est bien celle qui est autorisée pour la fabrication de vaccins et si elle est différente des autres souches utilisées dans le laboratoire . Le problème posé relève donc des méthodes dites de classification numérique utilisées en statistique (27,48,96,134,144) .

Sur les conseils de Monsieur P.LAZAR , de l'Unité de Recherches Statistiques INSERM-Villejuif , que nous tenons à remercier , nous allons :

- définir une " ressemblance " (sur la base des mesures immunologiques effectuées) entre deux souches cellulaires ou deux examens d'une même souche
- classer l'ensemble des examens de fibroblastes en sous-groupes " homogènes " et différents entre eux , les divers examens d'une même souche de fibroblastes figureront obligatoirement dans le même sous-groupe .

Définition d'une ressemblance entre deux empreintes de deux souches cellulaires différentes ou d'une même souche .

Les " empreintes " obtenues par la RFC présentent des résultats quantitatifs allant de 0 à 4 , nous avons ainsi écarté le coefficient de ressemblance de PEARSON qui ne fait état que de la présence ou de l'absence d'un attribut , en l'occurence réaction positive ou négative (96,144) .

Dans l'exemple suivant , sont présentées deux empreintes de la souche WI-38 :

1

1	4	0.	1	0.	0.	1
2	2	4	4	X	1	X
3	0.	0	2	1	0.	3
4	X	1	0.	0	0.	1
5	0.	0.	1	0	0	0
6	4	0.	1	0.	0.	1
7	2	4	4	X	1	X
8	0.	0	2	1	0.	3
9	X	1	0.	0.	0.	1
10	0.	0.	1	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

2

1	4	0.	1	0	1	1
2	2	4	4	X	2	X
3	0	0	2	1	0.	4
4	X	1	0	0	0	0
5	0.	0.	1	0	0	0
6	4	0	1	0	1	1
7	2	4	4	X	1	X
8	0	0	2	1	0.	3
9	X	1	0	0	0	0
10	0.	0.	0.	0	0	0
	A	B	C	D	E	F

En utilisant la méthode du χ^2 afin d'éprouver le degré d'association de ces deux résultats , il nous faut dresser le tableau comparatif suivant :

Intensité de la réaction	0	1	2 - 3	4	Total
Effectif observé empreinte 1	22 (22,5)	14 (13)	6 (6)	6 (6,5)	48
Effectif observé empreinte 2	23 (22,5)	12 (13)	6 (6)	7 (6,5)	48
Total	45	26	12	13	96

Les effectifs des valeurs observées , notées 2 et 3 , étant inférieurs à 5 , il est préférable de les regrouper pour calculer le . Dans ce cas , le degré de liberté est de trois . Les effectifs calculés sont indiqués entre parenthèses ; soient O les effectifs observés et C les effectifs calculés :

$$\chi^2 = \frac{\Sigma(O-C)^2}{C} = 2\left[\frac{(22-22,5)^2}{22,5} + \frac{(14-13)^2}{13} + \frac{(6-6)^2}{6} + \frac{(6,5-6)^2}{6,5}\right]$$

$$= 0,25$$

Les tables indiquent $\alpha = 0,95$ pour $\chi^2 = 0,35$ à trois degrés de liberté . Les deux empreintes de WI-38 diffèrent donc pour un risque supérieur à 95% .

L'emploi du coefficient de ressemblance r , avec les mêmes empreintes, améliore et affine la comparaison : soient x l'intensité de la réaction lue dans la cupule A1 de la plaque 1 et y la valeur lue pour la même cupule mais dans la plaque 2 . Relevons ainsi les couples de valeur de toutes les cupules et désignons par Σxy = la somme des produits de chaque couple (x, y)

S_x^2 = variance de x $\qquad$ S_y^2 = variance de y

$\bar{x}$ = valeur moyenne de x $\qquad$ $\bar{y}$ = valeur moyenne de y

Σx = somme des x $\qquad$ Σy = somme des y

Σx^2 = somme des x^2 $\qquad$ Σy^2 = somme des y^2

N = nombre de couples (x, y) observés

Le coefficient de corrélation quantitatif est donné par deux formules équivalentes :

$$r = \frac{\frac{\Sigma xy}{N} - (\bar{x}.\bar{y})}{\sqrt{S_x^2 . S_y^2}} \quad (91) \quad \text{ou} \quad r = \frac{\Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{N}}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}\right]\left[\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N}\right]}} \quad (134)$$

Pour les deux empreintes de WI-38 prises en exemples où il n'y a que 48 réactions de fixation du complément en présence d'immunsérums , les autres cupules étant des témoins divers :

$$r = \frac{\frac{\Sigma xy}{N} - (\bar{x}.\bar{y})}{\sqrt{S_x^2 . S_y^2}} = \frac{\frac{145}{48} - \left(\frac{52}{48} . \frac{53}{48}\right)}{\sqrt{\left[\frac{144}{48} - \left(\frac{52}{48}\right)^2\right]\left[\frac{153}{48} - \left(\frac{53}{48}\right)^2\right]}} = 0,96$$

Cette valeur de r exprime une association très étroite entre les deux empreintes de la souche WI-38 .

Reproductibilité de l'empreinte

Nous avons étudié une même souche de fibroblastes cinq fois , à plusieurs jours d'intervalle , avec les mêmes immunsérums et réactifs dans les conditions déjà décrites de la RFC . Une première suspension cellulaire a été préparée puis examinée deux jours de suite , avec conservation de la suspension cellulaire à 4°C , puis une deuxième préparation de fibroblastes a été étudiée dans les mêmes conditions pendant trois jours successifs .

Le tableau 12 montre les cinq résultats ainsi que les valeurs des coefficients de corrélation correspondants calculées selon la formule précédemment indiquée . Les chiffres obtenus montrent que la reproductibilité de l'em-

preinte est excellente .

Le coefficient de corrélation r quantitatif nous donnant entière satisfaction , nous l'avons utilisé pour comparer les vingt souches de fibroblaste dont nous disposons ; cette étude est effectuée en confrontant chaque cellule avec les dix neuf autres . Les valeurs obtenues varient de -0,16 à 0,89 et sont présentées aux tableaux 13 et 14 .

Examinons maintenant la signification de ces valeurs de r par rapport aux nuages de dispersion des résultats comparés , aux valeurs de χ^2 et aux antigènes présents . Portons en abscisses les valeurs de x et en ordonnées celles de y .Chaque cupule des deux plaques à comparer est représentée par un point de coordonnées (x,y) qui sont les valeurs de l'intensité de la réaction lue . L'ensemble des cupules donne ainsi un nuage de points traduisant le coefficient r .

La figure 15 compare la cellule WI-38 à elle-même (deux empreintes consécutives , cf page 75) et aux empreintes de quatre autres souches de fibroblastes (cf pages 68 , 69 , 72) .

TABLEAU 12

REPRODUCTIBILITE DE L'EMPREINTE : cellules n°17

Valeurs du coefficient de corrélation r xI00

Test n°	I	2	3	4
2	96			
3	97	99		
4	97	98	99	
5	98	98	99	98

I

	A	B	C	D	E	F
1	3	0	0.	0	0	0
2	I	3	3	X	0.	X
3	0	0	0	0	0	0.
4	X	0	0	0	3	0
5	0	I	0	0	0	0
6	4	0	0.	0	0	0
7	I	3	3	X	0.	X
8	0	0	0	0	0	0.
9	X	0	0	0	4	0
10	0	0.	0	0	0	0

2

	A	B	C	D	E	F
1	4	0.	0.	0	0	0
2	I	4	3	X	0.	X
3	0	0	0	0	0	I
4	X	0	0	0	3	0
5	0	I	0	0	0	0
6	4	0	0.	0	0	0
7	I	4	3	X	0.	X
8	0	0	0	0	0	I
9	X	0	0	0	3	0
10	0	I	0	0	0	0

3

	A	B	C	D	E	F
1	4	0.	0.	0	0	0
2	I	4	4	X	0.	X
3	0	0	0	0	0	I
4	X	0	0	0	4	0
5	0	I	0	0	0	0
6	4	0.	0.	0	0	0
7	I	4	4	X	0.	X
8	0	0	0	0	0	I
9	X	0	0	0	4	0
10	0	I	0	0	0	0

4

	A	B	C	D	E	F
1	3	0	0.	0	0	0
2	I	4	3	X	0.	X
3	0	0	0	0	0	I
4	X	0	0	0	4	0
5	0	I	0	0	0	0
6	4	0.	0.	0	0	0
7	I	4	3	X	0.	X
8	0	0	0	0	0	I
9	X	0	0	0	4	0
10	0	I	0	0	0	0

5

	A	B	C	D	E	F
1	4	0	0.	0	0	0
2	I	4	4	X	0.	X
3	0	0	0	0	0	I
4	X	0	0	0	4	0
5	0	I	0	0	0	0
6	4	0.	0.	0	0	0
7	I	4	4	X	0.	X
8	0	0	0	0	0	0.
9	X	0	0	0	4	0
10	0	I	0	0	0	0

TABLEAU 13

VALEURS DU COEFFICIENT DE CORRELATION

r X 100 ENTRE LES 20 CELLULES ETUDIEES

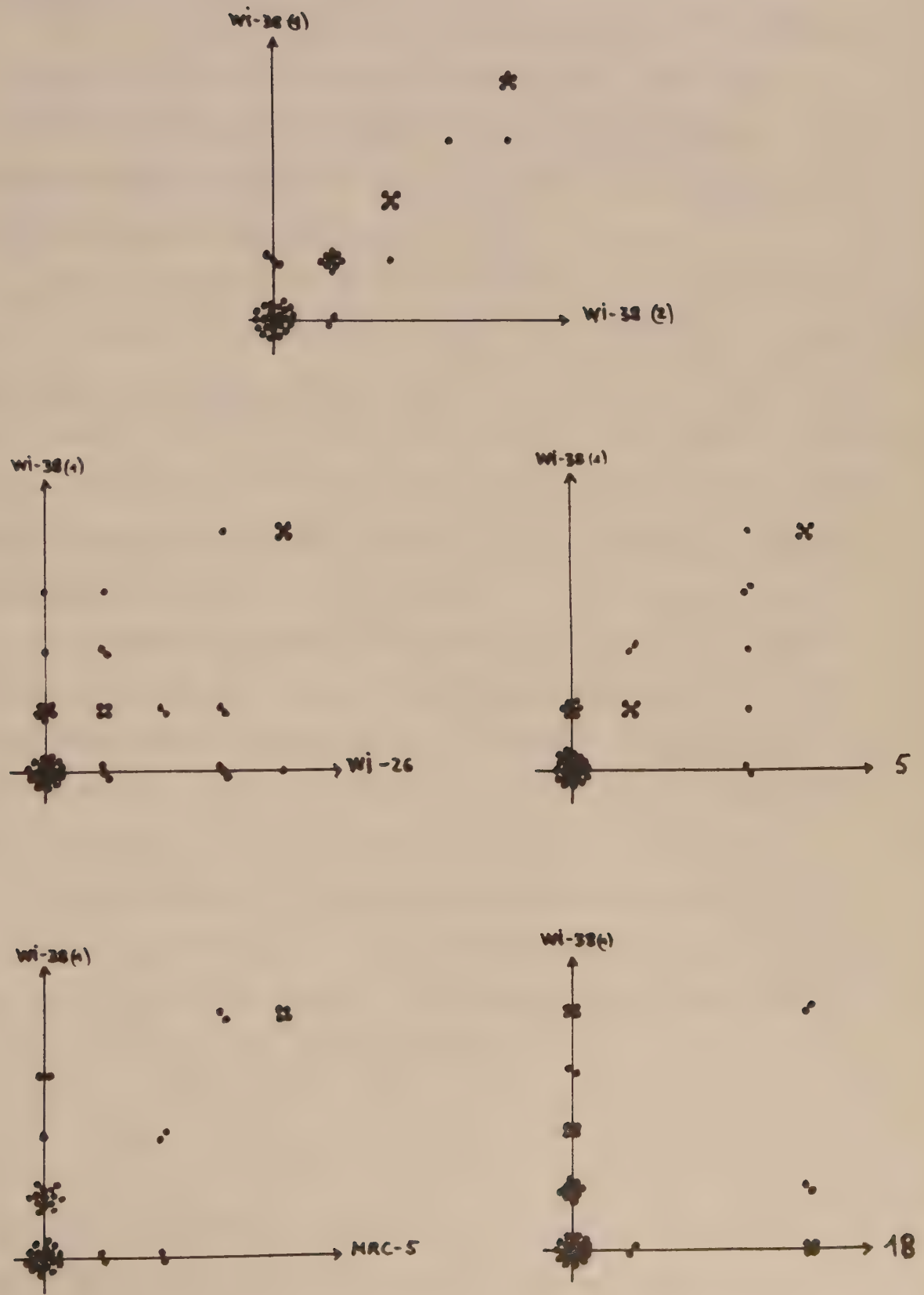
Cellules	WI-38	WI-26	MRC-5	4	5	6	7	8	9
WI-26	59								
MRC-5	83	58							
4	29	24	44						
5	82	50	76	62					
6	17	57	33	41	25				
7	3	40	6	34	12	63			
8	16	-5	36	51	19	40	9		
9	28	49	14	33	41	21	72	0	
10	63	39	75	63	69	63	36	62	27
11	30	34	34	47	28	52	71	41	58
12	37	10	33	30	36	21	-6	56	6
13	67	39	73	50	63	46	16	57	14
14	62	23	49	39	60	20	5	34	38
15	25	33	33	89	53	45	50	36	56
16	77	48	63	23	65	26	21	5	39
17	64	46	71	19	56	10	-5	1	3
18	3	65	12	34	6	36	63	13	58
19	87	59	78	27	78	14	-1	5	18
20	52	75	42	25	46	13	34	-16	37

TABLEAU 14

VALEURS DU COEFFICIENT DE CORRELATION r X 100 ENTRE LES 20 CELLULES ETUDIEES

Cellules	I0	II	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9
WI-26										
MRC-5										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
I0										
II	65									
I2	49	20								
I3	84	48	57							
I4	52	20	7I	63						
I5	59	54	29	45	33					
I6	53	27	30	6I	77	27				
I7	42	9	II	46	34	I3	48			
I8	2I	4I	-3	I4	6	5I	9	3		
I9	49	I5	20	53	45	22	6I	74	I9	
20	24	I5	-5	24	29	25	46	38	6I	67

FIGURE 15



Les valeurs de r et de χ^2 correspondants à la figure 15 sont :

Cellules		WI-38	WI-26	MRC-5	5	18
WI-38	r	0,96	0,59	0,83	0,82	0,03
	χ^2	0,25 *	1,04 *	12,78	3,46 *	14,06 °

* : non significatif

° : 2 degrés de liberté, les autres valeurs de χ^2 sont à 3 ddl

Il y a concordance entre l'aspect du diagramme de dispension des points (x, y) la valeur de r et les spécificités portées par les cellules ; mais le χ^2 est insuffisant pour la comparaison des "empreintes" des souches de fibroblastes. En effet, les antigènes détectés par la RFC sur les cellules examinées sont :

Cellules	Spécificités HL-A
WI-38	2, - / (5), -
WI-26	2, 1 /(W10) -
MRC-5	2, - / - ,(7)
5	2, 3 / (5), -
18	-, 1 / - ,(7)

(Rappelons ici que les antigènes du 2è locus sont faiblement révélés par la RFC et que pour cette raison ils sont marqués entre parenthèses)

Il y a ainsi concordance entre r et χ^2 pour les deux empreintes de WI-38 et pour les comparaisons entre WI-38 et la cellule n°18 où les antigènes sont tous différents ; la concordance entre r et χ^2 est moins bonne pour WI-38 comparé aux fibroblastes n°5 et WI-26 .

Par contre, WI-38 et MRC-5 se ressemblent par la présence en commun de l'antigène HL-A2 ; leur différence au 2è locus étant faiblement révélée, le coefficient de corrélation (0,83) traduit bien une relation entre les deux souches cellulaires, alors que le χ^2 (12,78) est significatif au seuil inférieur à 1% , i.e. les deux souches de fibroblastes sont très différentes .

L'imprécision du χ^2 provient du fait que la méthode varie en fonction du nombre des expériences, qu'elle ne fait pas la comparaison des réponses en fixation du complément pour chaque immunsérum et qu'il n'est tenu compte que d'un nombre global de résultats pour chaque intensité de réaction .

La méthode du χ^2 nous paraissant donc manquer de "puissance" pour définir la ressemblance entre cellules, nous avons été amenés à l'écarter . Nos comparaisons sont basées sur le coefficient de corrélation r .

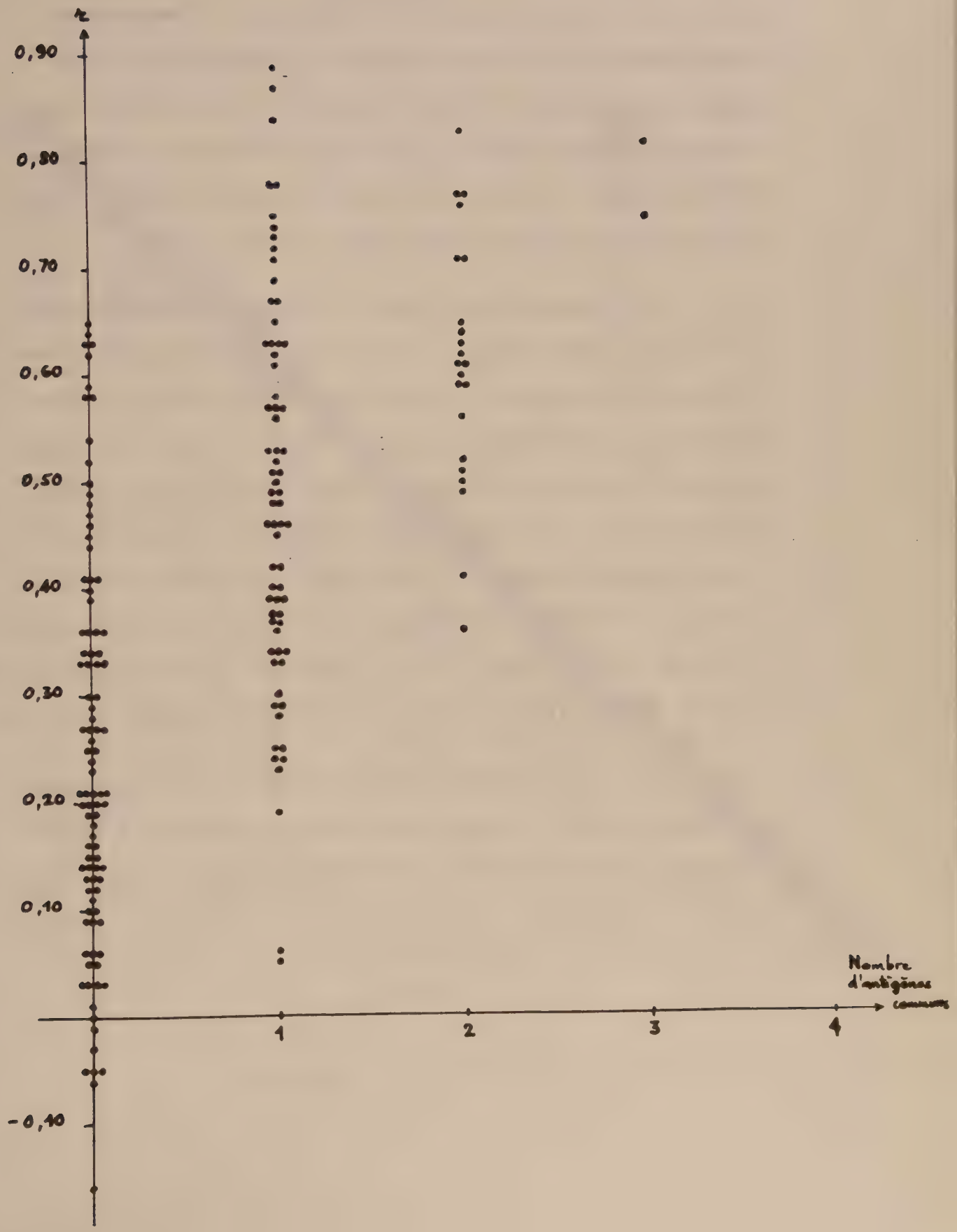
Classification des fibroblastes en sous-groupes

Les tableaux 13 et 14 (pages 80 et 81) ainsi que les résultats du tableau 11 (page 73) permettent de répartir les valeurs des coefficients r en différents sous-groupes.

Rappelons qu'il ne s'agit pas ici d'éprouver les coefficients de corrélation r par comparaison à zéro comme dans les problèmes statistiques habituels, mais seulement d'utiliser leur valeur numérique en tant que mesure d'une ressemblance. Ceci posé, la comparaison deux à deux des cellules n'ayant aucune communauté antigénique détectable par la méthode donne des valeurs de r allant de -0,16 (cellules n° 8 et 20) à + 0,20 (n° 12 et 19).

En incorporant les résultats obtenus par la méthode de cytotoxicité, la courbe représentant la variation de r en fonction du nombre d'antigènes communs est illustrée par la figure 16 (page 86) : les cellules possédant un antigène commun présentent entre elles un r moyen de 0,47 ; pour 2 antigènes communs, r oscille autour de 0,61 et pour trois spécificités identiques ou deux antigènes communs et une réponse identique à un anticorps "large" du type Da6, r moyen est de 0,78.

FIGURE 16

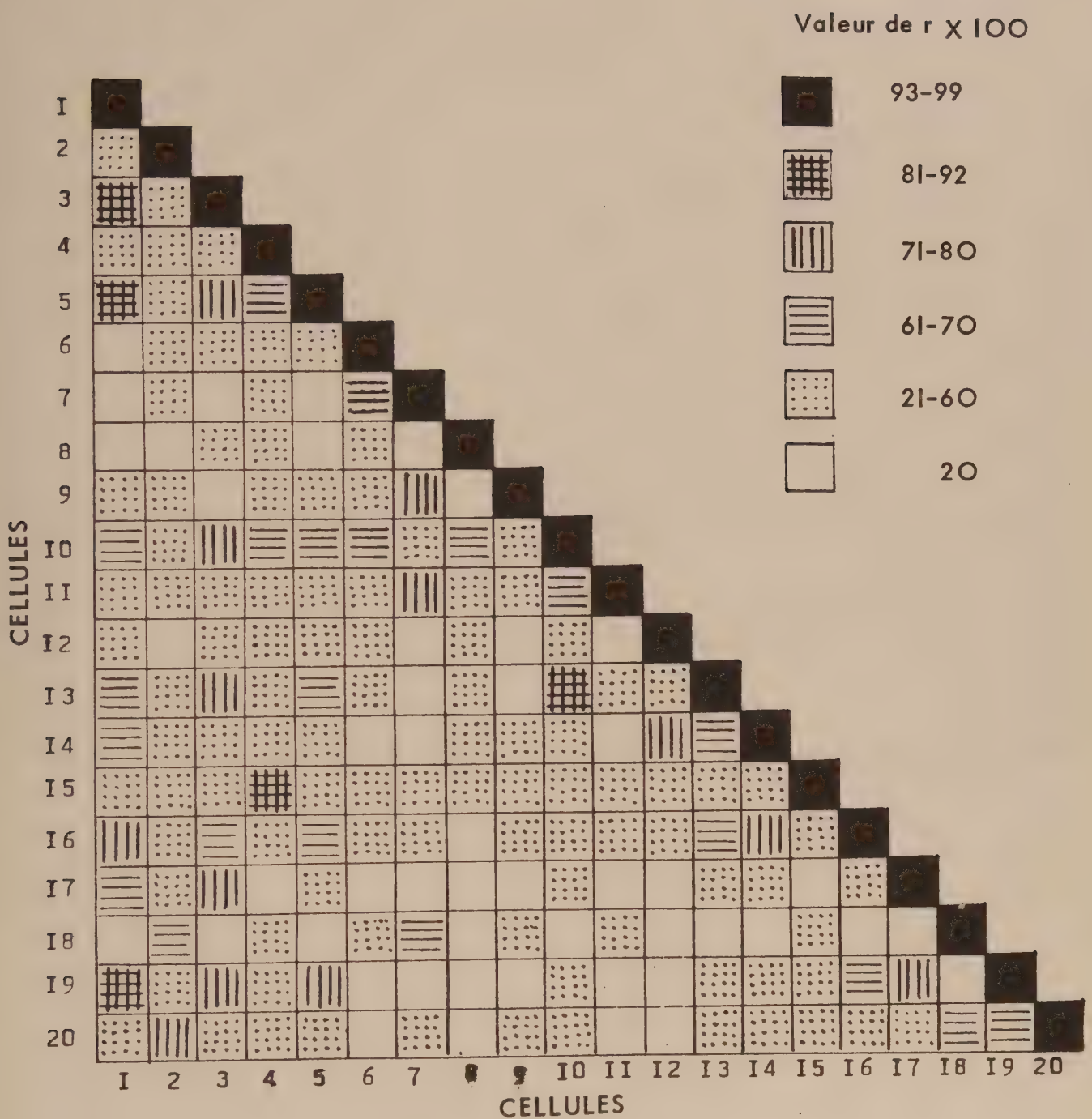

r
0,90
0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
-0,10
1
2
3
4
Nombre d'antigènes communs

Les expériences de reproductibilité de "l'empreinte" faites sur différentes souches cellulaires nous ont fourni des valeurs du coefficient de corrélation se groupant entre 0,96 et 1,00 pour le même type de fibroblastes ; il nous est arrivé de rares fois d'observer des r à 0,93 pour une même cellule.

Ces observations nous ont permis de nous fixer, pour une souche donnée, un seuil de ressemblance déterminé par l'empreinte obtenue lors de la RFC et par la valeur du coefficient r. Ce seuil fixera la limite au-delà de laquelle, vers les valeurs de $r \geqslant 0,93$, nous pourrons dire que la souche cellulaire examinée a de forte chance pour être identique à une souche de référence. A l'autre extrémité de l'échelle, un coefficient $r \leqslant 0,20$ sera obtenu avec un couple de fibroblastes n'ayant aucune communauté antigénique détectable par la méthode.

Les vingt souches de fibroblastes ont été ainsi classées en six sous-groupes dans le tableau 17 (page 88) avec leur intervalle de ressemblance.

TABLEAU 17



Intervalle de ressemblance des cellules

VII. DISCUSSION

Le principe utilisant les "empreintes" pour identifier une souche de fibroblastes, que ce soit par fixation du complément ou par cytotoxicité, peut être employé actuellement par n'importe quel Laboratoire comme réaction de routine, dans les conditions suivantes de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité.

La spécificité de la technique employée doit se restreindre aux antigènes HL-A. L'utilisation des sérums monospécifiques ou relativement "étroits" ainsi que l'élimination systématique de tout facteur anticomplémentaire rendent cette spécificité satisfaisante.

Les réactifs préparés extemporanément, les soins apportés dans l'ajustement du système hémolytique (complément, globules rouges sensibilisés) et le choix judicieux des immunsérums sont les éléments primordiaux pour disposer d'une réaction sensible donnant des résultats nettement positifs ou négatifs.

Les méthodes d'analyse statistique choisies montrent que les résultats sont parfaitement reproductibles si l'expé-

rimentateur a pris la précaution de travailler dans les mêmes conditions, avec de bons réactifs dont le plus important est l'antigène.

Dans la RFC appliquée aux fibroblastes, nous avons déjà exposé la faiblesse de la méthode pour révéler les antigènes du 2è locus, alors que les immunsérums utilisés sont très satisfaisants sur thrombocytes. Au cours de nos expériences, certaines souches de fibroblastes ont mieux répondu que d'autres au niveau du 2è locus : antigène HL-A7 de la cellule n° 8 ou antigène W10 du n° 19.

SASPORTES et coll. (131) ont montré dans leur étude que les antigènes HL-A5 et HL-A7 ne sont plus détectés par la réaction de cytotoxicité sur leurs souches de fibroblastes dès les 25è ou 40è passages, les cellules dégénérant après le 50è passage ; mais dans le cas présent, exceptées les cellules WI-38, WI-26 et MRC-5, toutes les souches de fibroblastes examinées avaient subi un nombre de passages inférieur. Par ailleurs, les cellules WI-38 gardent les mêmes antigènes entre les 25è et 32è passages (92), intervalle le plus utilisé lors de la production de vaccins.

Les conditions de la culture sont importantes à considérer si l'on veut obtenir des cellules ayant toutes leurs structures antigéniques. Il a été observé que les cellules lymphoïdes humaines de culture ont une concentration plus riche en déterminants antigéniques à leur surface que les lymphocytes périphériques (120). De même, le mar-

quage à la ferritine est plus fort sur les lymphocytes et les cellules lymphoïdes de culture que sur les cellules immatures de la moëlle (89).

L'antigénicité de la surface cellulaire est fonction des conditions de culture (118) et les travaux de CIKES (19,20) et PELLEGRINO (117) ont montré que la cellule est riche en antigènes d'histocompatibilité en période G_1, alors qu'en phase S, avec l'augmentation de la synthèse en ADN, elle s'appauvrit relativement : le volume cellulaire s'accroît en même temps que la surface membranaire, la cellule conserverait le même nombre de sites antigéniques et la néo-synthèse ne toucherait que les protéines de structure de la membrane. Après division, la cellule poursuit son cycle de croissance, passant par la période Go hypothétique, pour atteindre de nouveau son maximum d'antigènes d'histocompatibilité en période G_1.

Nos résultats obtenus par la RFC sont en concordance avec ceux qui sont obtenus par PELLEGRINO et coll. en cytotoxicité et adsorption : les fibroblastes, âgés de deux à trois jours après la trypsination, donnent de meilleures réponses ; les cellules, se cultivant mal ou se développant lentement par suite d'un nombre important de passages, perdent leur

positivité en fixation de complément ou deviennent anti-complémentaires quand on doit les utiliser dans la réaction à plus fortes concentrations qu'à l'ordinaire.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec des cellules cultivées dans des flacons en plastique. Au bout de trois à quatre jours au maximum, quel que soit l'état de confluence, les cellules sont récoltées par trypsination.

La préparation des suspensions cellulaires pourrait occasionner la perte ou le masquage des antigènes d'histocomptabilité. Fagraeus et Jonsson (57) ont montré que la récolte des cellules des flacons de culture par l'EDTA donne des cellules saines, vivantes et plus volumineuses que par le grattage puis remise en suspension par aspiration et refoulement répétés. La trypsination serait la plus mauvaise méthode, d'après DALEN et TODD (28) donnant de petites cellules. SCHLESINGER et coll. (132) ont pensé à un masquage possible des antigènes de la membrane cellulaire par la couche externe de mucopolysaccharides. Ces auteurs ont trouvé une augmentation de la sensibilité des cellules, après traitement à la neuraminidase, à l'effet cytotoxique du sérum de cobaye. Cette couche de mucopolysaccharides jouerait un rôle dans la variation des antigènes de surface (123).

Nous avons observé une réponse plus nette pour l'antigène W 21 de la cellule n° 17 après conservation de la suspension cellulaire à 4°C.

L'EDTA étant chélateur de l'ion Ca^{++} nécessaire à la fixation des divers constituants du complément, nous avons préféré l'exclure des méthodes de récolte des cellules. Le grattage et le broyage par aspiration-refoulement abiment les fibroblastes destinés à être groupés aussi par la néaction de cytotoxicité ; de plus, la récolte est pauvre et les résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec des cellules trypsinées ; c'est pourquoi nous sommes restés à cette dernière méthode en employant une attaque enzymatique douce déjà décrite (page47). Par ailleurs, nous avons éliminé le passage en milieu exalaté des fibroblastes trypsinés, protocole utilisé dans les travaux préliminaires (92,9 afin d'éviter la dénaturation des antigènes HL-A par trop d'agents chimiques.

Les travaux effectués au début de cette étude avec des immunsérums polyspécifiques anti HL-A nous ont procuré beaucoup de déboires ; en effet, il fallait les éprouver vis-à-vis des fibroblastes connus, comme WI-38 et WI-26, puis sélectionner les sérums positifs en RFC ; de cette manière, les sérums choisis couvraient un nombre restreint de spécificités et ce nombre diminuait encore dans le cas où les cellules de référence possédent des antigènes communs. La portée de la méthode fut restreinte car la RFC ne révèle pratiquement que les antigènes du 1er locus.

Pour augmenter l'éventail des spécificités, nous avions sélectionné les sérums positifs vis-à-vis des vingt cellules étudiées, tout en éliminant les sérums donnant des positivités avec toutes les cellules ; ceci nous a fourni une "batterie" de sérums permettant de trier grossièrement les fibroblastes par leurs "empreintes" mais n'a pas permis de déterminer l'activité HL-A d'un produit à l'étude.

D'autre part, la recherche du pouvoir anticomplémentaire de ces sérums polyspécifiques n'a pas été possible par la méthode utilisée en sérologie classique car il aurait fallu éprouver chaque anticorps d'un sérum avec l'antigène correspondant et éliminer les sérums présentant une anticomplémentarité en présence des antigènes cellulaires. Nous avons évité ce travail considérable en utilisant dans nos réactions des sérums relativement monospécifiques.

Pour le début de cette étude, nous avons disposé de souches de fibroblastes provenant de biopies de peau de donneurs normaux dont le génotype HL-A est connu. Ces souches, toutes très jeunes quant au nombre de passages (inférieur à dix), nous ont permis de vérifier la validité des réactions de fixation du complément et de cytotoxicité appliquées aux fibroblastes, avec les immunsérums définis

sur thrombocytes et lymphocytes. Ces immunsérums ont été décrits (pages 27 et 28).

Le tableau 18 (page 97) illustre d'une part la comparaison des résultats entre le groupage leuco-plaquettaire et celui des fibroblastes et, d'autre part, la différence et surtout la faiblesse des réponses des antigènes des fibroblastes, au niveau du 2è locus, entre la RFC et la réaction de cytotoxicité.

Les résultats de ce tableau montrent que les spécificités HL-A5, HL-A8, HL-A12 et W15 n'ont pas été révélés par la RFC. En ce qui concerne la détection de l'antigène HL-A8, l'immunsérum utilisé est très rare, l'anticorps correspondant est faible et plus "court" que ceux utilisés en cytotoxicité. Pour la cellule 262 : Da6 étant un anticorps "large" englobant les spécificités HL-A5, WS, W15 et W21, ont peut donc se contenter du résultat.

TABLEAU 18

Cellules	Spécificités HL-A détectées sur		
	LYMPHOCYTES et THROMBOCYTES	FIBROBLASTES par RFC	FIBROBLASTES par Réaction de cytotoxicité
262	2 , 9 / 27 , 5	2 , 9 / 27 ,Da6	2 , - / 27 , 5
400	1* / 7 , 8	1 , - / 7 , -	1 , - / 7 , 8
401	1 , 2 / 7 , X_2	1 , 2 / - -	1 , 2 / 7 , -
403	2 , 3 / 7 ,W10	2 , 3 / (7),W10	2 , 3 / (7),W10
404	2* /W21 ,W10	2 , - /W21 ,W10	2 , - /W21 ,W10
405	2 , X_1 / 12 ,W10	2 , - / Da6,W10	2 , - / 12 ,W10
406	9 ,10 / 27 , X_2	9 ,10 / - -	- ,10 / - -
407	1 , 2 /W15 , 8	1 , 2 /Da6 Da19 -	1 , 2 /W15 , 8

- : antigène non détecté

( ) : réaction faible

* : homozygote

X_1 et X_2 représentent des antigènes non détectés sérologiquement

De même, pour la cellule 405, dans un des sérums anti-Da6, il y a un anticorps anti HL-A12, ce n'est donc pas une réponse entièrement négative. Pour l'antigène W15, la RFC a été positive pour les spécificités Da6 et Da 19 pour la cellule 407, la réponse peut être considérée comme bonne

car Da 19 englobe W15 et W21.

A l'avantage de la RFC, citons l'excellente détection de l'antigène HL-A9, que ce soit pour la cellule 262 ou pour la cellule 406.

La réaction de cytotoxicité révèle mieux d'une façon générale les antigène du 2è locus; cependant, il faut signaler, parmi cette série de cellules-témoins, une mauvaise détection de HL-A9. La révélation de HL-A2 est par contre très satisfaisante, même avec des fibroblastes en mauvais état ou ayant subi un grand nombre de passages ; par ailleurs, cet antigène n'a été détecté que par cette méthode pour la souche de fibroblastes n° 10 (cf. page 73).

Quant à la spécificité HL-A27, les deux méthodes semblent concordantes, mais cet antigène n'a pas été détecté sur les fibroblastes 406.

La lignée polyploïde Hela, n'entrant pas dans cette étude concernant les fibroblastes diploïdes, n'a jamais pu être groupée par la RFC ni par la réaction de cytotoxicité car elle donne de nombreuses positivités avec un grand nombre de sérums monospécifiques anti-HL-A et nous n'avons pu conclure s'il s'agit d'une anticomplémentarité ou d'une existence à la surface de ces cellules d'un nombre d'antigènes supérieur à la normale.

VIII. CONCLUSION

Chez l'homme, le système HL-A est le plus important système d'histocompatibilité dont les antigènes pluri-tissulaires sont distribués en deux séries alléliques aux deux loci étroitement liés d'un autosome.

La trentaine de spécificités HL-A connues à ce jour est définie par différentes méthodes sérologiques. Le groupage HL-A est effectué de façon courante avec les thrombocytes par la RFC et avec les lymphocytes par la réaction de cytotoxicité.

Les deux techniques ont été adaptées aux souches de fibroblastes dans ce travail. Le but poursuivi est l'utilisation des marqueurs HL-A pour l'identification d'une souche cellulaire, avec deux possibilités :

1) identifier les fibroblastes par une méthode facile à appliquer dans n'importe quel laboratoire de contrôle de fabrication de vaccins.

2) grouper dans le système HL-A, d'une façon précise, les fibroblastes de culture en employant des méthodes standard qui pourraient être appliquées à d'autres types de cellules.

La première possibilité est réalisée avec la méthode des "empreintes" prises avec la RFC en utilisant une batterie de sérums relativement monospécifiques; cependant, des sérums polyspécifiques peuvent être employés mais ils doivent être choisis judicieusement pour couvrir l'ensemble des spécificités. Le classement des vingt souches de fibroblastes, par le calcul du coefficient de corrélation r , a permis de fixer un seuil de ressemblance ou d'identité et un seuil de différence complète au point de vue des marqueurs HL-A ; ces seuils sont déterminés en se référant au nombre d'antigènes

communs aux diverses cellules.

L'identification complète de la souche de fibroblastes par le groupage HL-A ne peut se faire qu'avec la somme des renseignements apportée tant par la réaction de cytotoxicité que par la RFC. Des améliorations restent à trouver sur le plan des préparations antigéniques et au niveau des anticorps pour éliminer les fausses réactions négatives.

L'étude de huit souches de fibroblastes , provenant de biopsies de peau et dont le génotype HL-A est connu, a démontré la validité du groupage HL-A sur fibroblastes; celui-ci a été pratiqué sur trois souches cellulaires utilisées dans divers laboratoires de virologie et sur d'autres souches provenant de poumons, de muscles ou d'embryons entiers humains dont le caryotype est normal .

Deux conclusions peuvent être tirées :

a) les antigènes HL-A se retrouvent sur les fibroblastes de culture qui en possèdent quatre au maximum aux deux loci , comme sur les lymphocytes ou les thrombocytes correspondants .

b) l'expression de ces antigènes de transplantation sur la surface cellulaire se fait dès les premiers mois de la vie , pendant la période de neutralité immunologique .

Après l'étude des fibroblastes normaux, nous poursuivons d'autres recherches pour savoir si l'expression des antigènes HL-A se fait normalement chez les cellules présentant des anomalies chromosomiques .

CHATENAY-MALABRY, le 8 SEPTEMBRE 1972.

VU et PERMIS d'IMPRIMER,

Le Vice-Président de l'Université PARIS-SUD,

Y. COHEN.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALBERT E., KANO K., ABEYOUNIS C.J. & MILGROM F.
Detection of human lymphocyte isoantigens by rabbit homotransplantation sera.
Transplantation, 8 : 466, 1969

2 - AMOS D.B., NICKS P.J., PEACOCKE N. & SIEKER H.O.
An evaluation of the normal lymphocyte transfer test in man.
J. of Clin. Invest., 44 : 219, 1965

3 - ASTER R.H., COOPER H.E., SINGER D.L.
Simplified complement fixation test for the detection of platelet antibodies in human serum.
J. Lab. Clin. Med., 63 : 161, 1964

4 - BACH F.H., HIRSCHORN K.
Lymphocyte interaction : a potential histocompatibility test in vitro.
Science, 143 : 813-820, 1964

5 - BAIN B., VAS M.R. & LOWEINSTEIN L.
The development of large immature monoclear cells in mixed leucocytes cultures.
Blood, 23 : 108-116, 1964

6 - BALNER H., GABB B.W., DERSJANT H., VAN VREESWIJK W., VAN LEEUWEN A., VAN ROOD J.J.
Heterologous antisera for human histocompatibility testing.
Transplant. Proc., 3 : 1088-1098, 1971

7 - BALNER H., VAN LEEUWEN A., DERSJANT H. & VAN ROOD J.J.
Chimpanzee iso antisera in relation to human leukocyte antigens
Histocompatibility Testing 1967, p.257, Munksgaard, Copenhagen.

8 - BATCHELOR J.R.
Antibody response of humans to allogenic skin grafts .
Histocompatibility Testing 1965,p.257, Munksgaard,Copenhagen

9 - BATCHELOR J.R.,SANDERSON A.
Further studies with cytotoxic human isoantisera .
Histocompatibility Testing 1967,p.139, Munksgaard,Copenhagen

10 - BATCHELOR J.R. & SELWOOD N.H.
HL-A subloci : are they valid ?
Histocompatibility Testing 1970,p.243, Munksgaard,Copenhagen

11 - BERAH M.,HORS J. & DAUSSET J.
Concentration of transplantation antigens in human organs .
Lancet, 2 : 106, 1968

12 - BERAH M.,HORS J. & DAUSSET J.
A study of HL-A antigens in human organs .
Transplantation, 9 : 185, 1970

13 - BLACK P.H.,HARTLEY J.W. & ROWE W.P.
Isolation of a cytomegalovirus from african green monkey .
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 112 : 601, 1963

14 - BODMER J.,BODMER W.F.,PAYNE R.,TERASAKI P.I. & VREDEVOE D.
Leucocyte antigens in man : a comparison of lymphocytotoxic and agglutination assays for their detection .
Nature, 210 : 28 , 1966

15 - BODMER W.F.,TRIPP M. & BODMER J.
Application of a fluochromatic cytotoxicity assay to human leucocyte typing .
Histocompatibility Testing 1967,p.341, Munksgaard,Copenhagen

16 - BOYUM A.
Separation of leucocytes from blood and bone marrow .
Scand.J.Clin.Lab.Invest., 21 :suppl. 97, 1968

17 - BREEN G.E.
"B" virus = Herpes virus simiae .
Lancet, 1 : 206, 1966

18 - CEPPELLINI R.,CELADA F.,MATTIUZ P.L. & ZANALDA A.
Study of the possible correlation between blood antigens and histocompatibility in man .I.Production of leukoagglutinin by repeated transfusions from one donor .
Ann N.Y. Acad. Sci., 120 (1) : 335, 1964

19 - CIKES M.
Variations in expression of surface antigens on cultured cells
Ann. N.Y. Acad. Sci., 177 : 190, 1971

20 - CIKES M.
Expression of surface antigens on cultured tumor cells in relation to cell cycle .
Transplant. Proc., III, 3 : 1161-1166, 1971

21 - COLOMBANI J., COLOMBANI M., BENAJAM A. & DAUSSET J.
Leucocytes and platelets antigens defined by platelet complement fixation test .
Histocompatibility Testing 1967, p.413, Munksgaard, Copenhagen

22 - COLOMBANI M., COLOMBANI J., DEHAY C. & DAUSSET J.
A microtechnique of platelet complement fixation. Results obtained with sera and eluates as source of antibody .
Histocompatibility Testing 1970, p.553, Munksgaard, Copenhagen

23 - COLOMBANI J., D'AMARO J., GABB B.W., SMITH G.S. & SVEJGAARD A.
International agreement on a microtechnique of platalet complement fixation .
Transplant. Proc., 3 : 121 , 1971

24 - COLOMBANI M., COLOMBANI J., DASTOT H., ELIAS A. & DAUSSET J.
Intérêt de l'utilisation du sérum humain comme source de complément dans une réaction de fixation du complément sur antigène plaquettaire .
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 8 : 864, 1968

25 - COLOMBANI J.
Blood platelets in HL-A serology .
Transplant. Proc., III, 2 : 1078, 1971

26 - COOMBS R.R.A. & BEDFORD D.
The A and B antigens on human platelets demonstrated by means of mixed erythrocyte-platelet agglutination .
Vox Sang., 5 : 111-115, 1955

27 - DAGNELIE P.
A propos de différentes méthodes de classification numérique.
Rev. Stat. Appl., 14 : 55-75, 1966

28 - DALEN H., TODD P.W.
Surface morphology of trypsinized human cells in vitro .
Exp. Cell. Research, vol 66, 2 : 353, 1971

29 - D'AMARO J.
The micro complement fixation test. I.A solution of the technical problem of HL-A typing ?
Vox Sang., 18 : 334, 1970

30 - DAUSSET J. & NENNA A.
Présence d'une leuco-agglutinine dans le sérum d'un cas d'agranulocytose chronique .
Compt. Rend. Soc. Biol., 146 : 1539, 1952

31 - DAUSSET J.,NENNA A. & BRECY H.
Leukoagglutinins. V.Leukoagglutinins in chronic idiopathic or symptomatic pancytopenia and in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria .
Blood, 9 : 696, 1954

32 - DAUSSET J. & NENNA A.
Iso-leuco-anticorps .
Acta Haemat., 20 : 156, 1958

33 - DAUSSET J.,COLOMBANI J. & OKOCHI K.
Leucocyte and platelet agglutination.
In JF Ackroyd, Immunological methods,p.539, 1964
Blackwell Scientific Publications Ed.,Oxford

34 - DAUSSET J.,IVANYI P. & IVANYI D.
Tissues alloantigens in humans : identification of complex system (Hu-1).
Histocompatibility Testing 1965, p.51, Munksgaard,Copenhagen

35 - DAUSSET J.,COLOMBANI J.,COLOMBANI M.,LEGRAND L. & FEINGOLD N.
Un nouvel antigène du système HL-A (Hu-1) : l'antigène 15, allèle possible des antigènes 1,11,12 .
Nouv.Rev.Franç.Hémat., 8 : 398, 1968

36 - DAUSSET J.,COLOMBANI J,COLOMBANI M.,LEGRAND L. & FEINGOLD N.
Génétique du système HL-A .Fréquences génique,haplotypique et génotypique observées dans 113 familles .
Nouv.Rev.Franç.Hémat., 9 : 749, 1969

37 - DAUSSET J.,COLOMBANI J. & LEGRANG L.
Les sub-loci du système HL-A .Le système principal d'histo-compatibilité de l'homme .
Presse Méd., 77 : 849, 1969

38 - DAUSSET J.,WALFORD R.L. & COLOMBANI J.
The HL-A system sub-loci and their importance in transplantatio
Transplant. Proc., I ,331, 1969

39 - DAUSSET J., COLOMBANI J., LEGRAND L. & FELLOUS M.
Genetics of the HL-A system . Deduction of 480 haplotypes.
Histocompatibility Testing 1970, p. 53, Munksgaard, Copenhagen

40 - DAUSSET J.
The genetics of transplantation antigens .
Transplant. Proc., III, 1 : 8-14 , 1971

41 - DAUSSET J. & HORS J.
Les transplantations de reins effectuées entre donneurs et receveurs groupés dans le système HL-A .
La Nouv. Presse Méd., 19 : 1273, 1972

42 - DAVIES D.A.L., COLOMBANI J., VIZA D.C. & DAUSSET J.
Isoantigens of mice and their human homologues .
Histocompatibility Testing 1967, p. 287, Munksgaard, Copenhagen

43 - DAVIES D.A.L., COLOMBANI J., VIZA D.C. & DAUSSET J.
Human HL-A transplantation antigens : separation of molecules carrying different immunological specificities determined by a single genotype .
Biochem. Biophys. Res. Comm., 33 : 88, 1968

44 - DAVIES D.A.L., MANSTONE A.J., VIZA D.C., COLOMBANI J., DAUSSET J.
Human transplantation antigens : the HL-A (Hu-1) system and its homology with the mouse H-2 system .
Transplantation, 6 : 571, 1968

45 - DEFENDI V.
Transformation in vitro of Mammalian cells by Polyoma and Simian 40 viruses .
Progress in Exp. Tumor Res., 8 : 1966

46 - DE PLANQUE B., WILLIAMS G.M., SIEGEL A. & ALVAREZ C.
Comparative typing of human kidney cells and lymphocytes by immune adherence .
Transplantation, 8 : 852, 1969

47 - DORF M.E. & METZGAR R.S.
Serological relationship of human, chimpanzee and gorilla lymphocytes antigens .
Histocompatibility Testing 1970, p.287, Munksgaard, Copenhagen

48 - DUCIMETIERE P.
Les méthodes de la classification numérique .
Rev. Stat. Appl., XVIII, 4 : 5-25, 1970

49 - DZAGUROV S.G. & ALPATOVA G.A.
Exparimental study of oncogenic adenovirus derived from green monkey tissue .
Proc. Symposium on Oncogenicity of Virus Vaccines- Zagreb, 1963

50 - EDDY B.,BORMAN G.,BERKELEY W. & YOUNG R.
Tumors induced in hamsters by injection of Rhesus monkey cells extracts .
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107 : 191-197, 1961

51 - ENGELFRIET C.P. & BRITTEN A.
The cytotoxic test for leucocyte antibodies. A simple and reliable technique .
Vox Sang., 10 : 660, 1965

52 - ENGELFRIET C.P.
Cytotoxic antibodies against leukocytes .
Histocompatibility Testing 1965, p.245, Munksgaard,Copenhagen

53 - ENGELFRIET C.P.,HEERSCHE J.N.M.,EIJSVOOGEL V.R.,V LOGHEM J.J.
Demonstration of leukocyte iso-antigens on skin fibroblasts by mean of the cytotoxic antibody test .
Vox Sang., 11 : 625, 1966

54 - ENGELFRIET C.P.,HEERSCHE J., EIJSVOOGEL V.R.,VAN LOGHEM J.J.
Demonstration of leukocyte iso-antigens on skin fibroblasts by mean of the cytotoxic antibody test
Vox Sang., 11: 625, 1966

55 - ENGELFRIET C.P.,BRITTEN A.
Cytotoxic antibodies against leucocytes .
Vox Sang., 11 : 334, 1966

56 - ENGELFRIET C.P.,MELIEF CJM,VAN DER HART M.,VAN LOGHEM J.J.
The importance of the immune adherence assay for the demonstration of leucocyte isoantigens on leucocytes and cells of other tissues .
Histocompatibility Testing 1967,p.407, Munksgaard,Copenhagen

57 - FAGRAEUS A.,JONSSON J.
Studies on surface antigens on cultured cells.
Ann.N.Y. Acad. Sci.,vol 177, 183, 1971

58 - FERRONE S.,TOSI R.M.,CENTIS D.
Anticomplementarity factors affecting the lymphocytotoxicity test .
Histocompatibility Testing 1967, p.357, Munksgaard,Copenhagen

59 - FERRONE S.,PELLEGRINO M.A. & REISFELD R.A.
A rapid method for direct HL-A typing of cultured lymphoid cel
J. of Immun.,107 :613-615, 1971

60 - FERRONE S.,COOPER N.R.,PELLEGRINO M.A. & REISFELD R.A.
The lymphocytotoxic reaction : the mechanism of rabbit complement action .
J. of Immun.,107 : 939-947, 1971

61 - FINNEY D.J.
Statistical method in biological assay .
Charles Griffin & Co, London, 1964

62 - FISHER R.A. & YATES F.
Statistical tables for biological and medical research .
Oliver and Boyd, London, 1957

63 - FLYNN R.,TROUP G.M. & WALFORD R.L.
Cytotoxic test with frozen lymphocytes .
Int. Arch. Allergy, 29 : 478, 1966

64 - FULTON F.
Immune adherence to tissue culture .
Nature, 207 : 1214, 1965

65 - GABB B.W. & BODMER W.F.
A micro complement fixation test for platelet antibodies .
Histocompatibility Testing 1970, p.543, Munksgaard,Copenhagen

66 - GERVAIS A.G.
Detection of mouse histocompatibility antigens by immuno-fluorescence .
Transplantation, 6 : 26, 1968

67 - GORER P.A.& O'GORMAN P.
The cytotoxic activity of isoantibodies in mice .
Transplant. Bull., 3 : 142-143, 1956

68 - GREENWALT T.J.,GAJEWSKI M. & Mc KENNA J.L.
A new method for preparing buffy coat-poor blood.
Transf., 2 : 221, 1962 (Philadel.)

69 - HAMMOND D.,MATTIUZ P.L. & CURTONI E.S.
Development of cytotoxic antibody against human leucocytes by transfusion from selected donors .
Histocompatibility Testing 1967,p.325, Munksgaard,Copenhagen

70 - HAMMOND M.G. & BRAIN P.
Leucocytes group in baboons tested with human antisera .
South African Med. J., 44 : 380, 1970

71 - HARRIS R. & ZERVAS J.D.
Reticulocyte HL-A antigens .
Nature, 221 : 1062, 1969

72 - HAYFLICK L.,PLOTKIN S.A.,NORTON T.W. & KOPROWSKI H
Preparation of Poliovirus vaccine in human fetal diploid cell strain .
Amer. J. Hyg., 75 : 240-258, 1962

73 - HAYFLICK L.
A comparison of primary monkey kidney,heteroploid cell lines and human diploid cell strain for human virus vaccine preparation .
Amer. Rev. Resp. Dis., 88 : suppl.,387-393, 1963

74 - HAYFLICK L.
The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains .
Exp. Cell. Res., 37 : 614-636, 1965

75 - HECKEL C.
Allo-immunisation foeto-maternelle. Anticorps anti HL-A et grossesse .
Thèse de Médecine, Paris, 1971

76 - HIRATA A.A.,AMRSTRONG A.S.,KAY J.W.D. & TERASAKI P.I.
Specificity of inhibition of HL-A antisera by streptococcal M proteins .
Histocompatibility Testing 1970,p.475-481,Munksgaard,Copenhagen

77 - HIRATA A.A. & TERASAKI P.I.
Cross reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens .
Science, 168 : 1095-1096, 1970

78 - HSIUNG G. & GAYLORD W.
The vacuolating virus of monkey .
J. of Exp. Med., 114 : 975-996, 1961

79 - HUEBNER R.J.
The problem of oncogenicity of adenovirus.
First Intern. Conf.on Vaccines, Washington nov. 1966

80 - HULL R.N.,MINNER J.R. & MASCOLI
New viral antigens recovered from tissue culture of monkey kidney cells .
Amer. J. of Hyg., 68 : 31-44, 1958

81 - HULL R.N.,JOHNSON I.S.,CULBERSON C.G.,REIMER C.B. & WRIGHT H.F.
Oncogenicity of the Simian Adenovirus
Science, 150 : 1044-1046, 1965

82 - IKIC D.
The safety of human diploid cell strains for man : a controlled study of symptoms occurring after the administration of WM-3 living attenuated poliovirus vaccine prepared in the WI-38 human diploid cell strain.
Amer. J. Epidem., 87 : 411-418, 1968

83 - JACOBS J.P.,JONES C.M. & BAILLE J.P.
Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5 .
Nature, 227 : 168-170, 1970

84 - JARDINE N. & SIBSON R.
The construction of hierarchic and non hierarchic classification .
Comp. J., 11 : 177-184, 1968

85 - JOHNSON T.M. & GARVIN J.E.
Separation of lymphocytes in human blood by mean of glass wool column .
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 102 : 333, 1959

86 - KEMPF R.A.,GIGLI I. & AUSTEN K.F.
An explanation for the inefficiency of guinea-pig complement in the cytolysis of sheep erythrocytes or rat mast cells sensitized with rabbit antiserum : a double block.
Transplant. Proc., I : 626, 1969

87 - KISSMEYER-NIELSEN F.,SVEJGAARD A. & HAUGE M.
Genetic of the human HL-A transplantation system.
Nature, 219 : 1116, 1968

88 - KISSMEYER-NIELSEN F.,SVEJGAARD A. & THORSBY E.
Possibility of a third locus .
Transplant. Proc., III, 1 : 81, 1971

89 - KOURILSKY F.M.,SILVESTRE D.,LEVY J.P.,DAUSSET J.,NICOLAI M.G. & SENIK A.
Immunoferritin study of the distribution of HL-A antigens on human blood cells .
J. of Immun., 106 : 454-466, 1971

90 - KRUSKAL W.H. & GOODMAN L.A.
Measures of association for cross classifications .
JASA, 49 : 734-764, 1954

91 - LAMOTTE
Initiation aux méthodes statistiques en biologie.
Masson éditeur, p.123, 1957

92 - LAPEYRE D.,HORS J.,DAUSSET J.,COLOMBANI J. & NETTER R.
HL-A antigens detected by complement fixation reaction in tissue culture human embryonic cells .
Proc. Symp. on Human Diploid Cells - Zagreb, sept. 1970

93 - LAPEYRE D.,HORS J.,COLOMBANI J. & NETTER R.
Identification by HL-A markers of human cells used for vaccines
IIIè Congrès Intern. de Standardisation Biologique,Annecy,1971

94 - LEBRUN A.,SASPORTES M.,LEBRUN D. & DAUSSET J.
Rôle prépondérant du 2è locus HL-A (ou d'un gène lié) dans la réaction de culture mixte lymphocytaire .
C. R. Acad. Sci.,Paris 273 : 2130, 1971

95 - LEGRAND L.,DAUSSET J. & RAPAPORT F.T.
Serological and genetic studies of the HL-A system. Results of host immunization within haplo-identical donor-recipient combinations .
Transfusion, 11 : 233, 1971

96 - LERMAN I.C.
Les bases de la classification automatique.
Coll. Programmation, Gauthiers-Villars, Paris 1970

97 - LOOSFELT Y.,PAVIE-FISCHER J. & KOURILSKI F.M.
Technique d'immunofluorescence de membrane appliquée à la détection des antigènes tissulaires sur les cellules sanguines humaines .
Path. Biol., 18 : 795-798, 1970

98 - MANN D.L.,ROGENTINE N.,FAHEY J.L.& NATHENSON S.
Solubilization of human leucocyte membrane isoantigens .
Nature, 217 : 1180, 1968

99 - MAUPIN B.
Technique de séparation des globules blancs .
Rev. Hémat., 14 : 250 et 355, 1959

100 - MAYER M.M.
in Kabat EA & Mayer MM(Eds): Experimental immunochemistry.
Sprinfield Ill.,Thomas, 1961, p.214

101 - MICKEY M.R.,SINGAL D.P. & TERASAKI P.I.
Evidence for three HL-A subloci .
Transplant. Proc., 1 : 347-351, 1969

102 - MIGGIANO V.C.,NABHOLZ M. & BODMER W.F.
Detection of HL-A and other antigens on fibroblast micro monolayers using a fluorochromatic cytotoxicity assay .
Histocompatibility Testing 1970,p.623, Munksgaard,Copenhagen

103 - MILGROM F. & KANO K.
Application of cells cultures for human tissue typing .
Histocompatibility Testing 1965,p.179, Munksgaard,Copenhagen

104 - MITTAL K.K.,MICKEY M.R.,SINGAL D.P. & TERASAKI P.I.
Serotyping for homotransplantation .
Transplantation, 6 : 913, 1968

105 - MITTAL K.K.,TERASAKI P.I.,Mc INTIRE F.C. & HIRATA A.A.
Cross-reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides .
Intern. Congress of the Transplant. Soc.,Evian,15 mai 1972

106 - MIYAKAWA Y.,TANIGAKI N.,YAGI Y. & PRESSMAN D.
An efficient method for isolation of HL-A antigens from hematopoietic cell lines .
J.of Immun., 107 : 394, 1971

108 - MIYAKAWA Y.,TANIGAKI N.,YAGI Y.,COHEN E. & PRESSMAN D.
A micro immune adherence test for the detection of HL-A antigens
J.of Immun., 106 : 681, 1971

107 - MIYAKAWA Y.,TANIGAKI N.,YAGI Y. & PRESSMAN D.
Human transplantation antigens : isolation and radioimmunoassay
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 136 : 899, 1971

109 - MORRIS J.,JOHNSON K.,AULISIO G.,CHANOCK R. & KNIGHT V.
Clinical and serological responses in volunteers given vacuolating virus by respiratory route .
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 108 : 56-59, 1961

110 - MORRIS P.J.,HUME D.M. &TERASAKI P.I.
The development of cytotoxic antibodies in renal transplantation
Histocompatibility Testing 1967,p.339, Munksgaard,Copenhagen

111 - NEEDHAM R.M. & JONES K.S.
Keywords and clumps .
J. Docum., 20 : 5 ,1964

112 - NELSON R.A. Jr
The immune adherence phenomenon .
Science, 118 : 733 , 1953

113 - O.M.S.
Rapports techniques : Virus et cancer.
Genève , 1965

114 - PAYNE R. & ROLFS M.R.
Fetomaternal leukocyte incompatibility .
J. Clin. Invest., 37 : 1756 , 1958

115 - PAYNE R.,PERKINS H.A. & NAJARIAN J.S.
Compatibility for seven leukocyte antigens in renal homografts :utilization of a micro agglutination test with few sera
Histocompatibility Testing 1967,p.237, Munksgaard,Copenhagen

116 - PAYNE R.,BODMER W.F.,TROUP G.M. & WALFORD R.L.
Serologic activities and specificities of eleven human leukocyte antisera produced by planned immunization .
Transplantation, 5 : 597 , 1967

117 - PELLEGRINO M.A.,FERRONE S.,NATALI P.G.,PELLEGRINO A. & REISFELD R.A.
Expression of HL-A antigens in synchronized cultures of human lymphocytes .
J. of Immun., 108 : 573-576 , 1972

118 - RAPAPORT F.T. & CHASE R.M. Jr
Transplantation antigen-like activity of streptococcal cells.
Histocompatibility Testing 1965,p.171,Munksgaard,Copenhagen

119 - REISFELD R.A.,PELLEGRINO M.A.,PAPERMASTER B.W.& KAHAN B.D.
HL-A antigens from a continuous cell line derived from a normal donor.I.Solubilization and serologic characterization.
J.of Immun., 104 : 560-565 , 1970

120 - ROGENTINE GN Jr &GERBER P.
Qualitative and quantitative comparisons of HL-A antigens on different lymphoid cell types from the same individuals.
Histocompatibility Testing 1970,p.333, Munksgaard,Copenhagen

121 - ROGENTINE G.N.,PLOCINIK B.
Application of the 51-Cr cytotoxicity technique to the analysis of human lymphocyte isoantigens .
Transplantation, 5 : 1323 , 1967

122 - ROGENTINE G.N. Jr
Detection of isoantigens in human lymphocytes and tissue culture cells by the 51-Cr cytotoxicity technique .
Histocompatibility Testing 1967,p.371,Munksgaard,Copenhagen

123 - ROSENFELD C. & DORE J.F.
Variations des antigènes de membrane des cellules de lignées permanentes établies à partir de leucocytes humains normaux et leucémiques .
Soc. Franç. d'Immun.,13-15 avril 1972

124 - ROSENFIELD R.E.,RUBINSTEIN P.,LALEZARI P.,DAUSSET J. & VAN ROOD J.J.
Hemagglutination by human anti leukocyte sera
Vox Sang., 13 : 461 , 1967

125 - ROWE W.P. & BAUM S.G.
Evidence for a possible genetic hybride between Adenovirus type 7 and SV-40 viruses .
Proc.Nat.Acad. Sci., 52 : 1340-1346, 1964

126 - RUBIN J.
Optimal classification into groups : an approach for solving the taxonomy problem .
J. Theoret. Biol., 15 : 103-144 , 1967

127 - SABIN A.B. & WRIGHT A.M.
Acute ascending myelitis following a monkey bite, with isolation of a virus capable of reproducing the disease .
J. Exp. Med., 59 : 115 , 1934

128 - SANDERSON A.R.
Tissue typing in man .
Nature, 215 : 23 , 1967

129 - SANDERSON A.,BATCHELOR R.
Lymphocytotoxic reactions of human iso antisera detected by release of chromium-51 label or by dye exclusion .
Histocompatibility Testing 1967,p.367,Munksgaard,Copenhagen

130 - SANDERSON A.R.,CRESSWELL P. & WELSCH K.I.
Implication of carbohydrate in the immunochemical determinant area of HL-A substances .
Transplant. Proc., III , 1 :220 , 1971

131 - SASPORTES M.,DEHAY C. & FELLOUS M.
Variations of the expression of HL-A antigens on human diploid fibroblasts in vitro .
Nature, 233 : 332-334 , 1971

132 - SCHLESINGER M. & AMOS B.D.
Effect of neuraminidase on serological properties of murine lymphoid cells .
Transplant. Proc.,III, 1 : 895 , 1971

133 - SCHWARTZ D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes
Ed. Médicales Flammarion, Paris

134 - SCHWARTZ D. & LAZAR P.
Eléments de statistique médicale et biologique .
Ed. Médicales Flammarion, Paris

135 - SELL K.W.,MORI W.,RACK J.H.,GURNER B.W. & COOMBS R.R.A.
Organ specific membrane antigens .
Brit. J. Exp. Path., 50 : 413-426 , 1969

136 - SELL K.W.
Histocompatibility testing by immune adherence .
Histocompatibility Testing 1970,p.617-621,Munksgaard Copenhagen

137 - SHULMAN N.R.,MARDER V.J.,HILLER M.C. & COLLIER
Platelet and leucocyte isoantigens and their antibodies : serologic, physiologic and clinical studies .
Progr. Haemat., 4 : 222 , 1964

138 - SHULMAN N.R.,MOOR-JANKOWSKI J. & HILLER M.C.
Platelet and leukocyte iso antigens common to man and other animals .
Histocompatibility Testing 1965,p.113, Munksgaard,Copenhagen

139 - SIEGERT R.,SHU H.L.,SLENCZKA W.,PETERS D. & MULLER G.
Zur Atiologie einer unbekannten von Affen ausgegangenen menschlichen Infektionskrankheit .
Dt. Med. Wschr., 92 : 2341 , 1967

140 - SILVESTRE D.,KOURILSKY F.M.,LEVY J.P. & SENIK A.
Localisation des antigènes HL-A à la surface des lymphocytes humains à l'aide d'anticorps conjugués à la ferritine.
C. R. Acad. Sci.(Paris), 268 : 1145-1147, 1969

141 - SMITH C.A.B.
Biomathematics. Vol. II
Charles Griffin & Co, London 1969

142 - SMITH C.E.G.,SIMPSON D.I.H.,BOWEN E.T.W. & ZLOTNIK I.
Fatal human disease from vervet monkeys .
Lancet, 2 : 1119 , 1967

143 - SMITH G.S. & WALFORD R.L.
A micro complement fixation method for determining isoantigens of human platelets .
Histocompatibility Testing 1970,p.549, Munksgaard,Copenhagen

144 - SOKAL R.P. & SNEATH P.H.A.
Principles of numerical taxonomy.
WH Freeman & Co, London 1963

145 - SVEJGAARD A. & KISSMEYER-NIELSEN F.
Cross-reactive human HL-A iso antibodies .
Nature, 219 : 868 , 1968

146 - SVEJGAARD A. & KISSMEYER-NIELSEN F.
Complement fixing platelet isoantibodies. I. A quantitative technique for their detection .
Vox Sang., 14 : 106 , 1968

147 - SVEJGAARD A.
Iso-antigenic systems of human blood platelets. A survey.
Series Haemat., II, 3 , 1969

148 - SVEJGAARD A.
Complement fixing platelet isoantibodies. IV. A comparison of human, guinea-pig and rabbit complement .
Vox Sang., 17 : 224 , 1969

149 - SVEJGAARD A.
Complement fixing platelet isoantibodies. III. Quantitation of the HL-A2 antigen on platelets.
Vox Sang., 17 : 112 , 1969

150 - SWEET B. & HILLEMAN R.
Detection of a "non detectable" simian virus (vacuolating agent) present in Rhesus and Cynomolgus monkey kidney cell culture material .
2nd Conf.Intern.on live Poliovirus vaccine,Washington 1960

151 - TABLE RONDE SUR LES CELLULES DIPLOIDES HUMAINES
Fondation Mérieux, Lyon 25-26 avril 1968

152 - TAMURA N.
An incompatibility in the reaction of the second component of human complement with the fourth component of guinea-pig complement .
Immunology, 18 : 203 , 1970

153 - TANIGAKI N.,MIYAKAWA Y.,YAGI Y. & PRESSMAN D.
HL-A antigens from hematopoietic cell lines : molecular size and electrophoretic mobility .
J. of Immun., 107 : 402 , 1971

154 - TERASAKI P.I. & Mc CLELLAND J.D.
Microdroplet assay of human serum cytotoxicis .
Nature, 204 : 998 , 1964

155 - TERASAKI P.I.,VREDEVOE D.L.,Mc CLELLAND J.D.
Serotyping for homotransplantation. VI.Use of cryogenically stored cells for purification of antisera .
Histocompatibility Testing 1965,p.267, Munksgaard,Copenhagen

156 - TERASAKI P.I.,VREDEVOE D.L. & MICKEY M.R.
Serotyping for homotransplantation .
Transplantation, 5 : 1057 , 1967

157 - TERASAKI P.I. & MICKEY M.R.
Histocompatibility-transplant correlation, reproducibility and new matching methods .
Transplant.Proc., III , 2 : 1057-1071 , 1971

158 - THORSBY E. & LIE S.
Antigens on human fibroblasts demonstrated with HL-A antisera and anti human lymphocyte gene .
Vox Sang., 15 : 44 , 1968

159 - TOSI R.M.,PELLEGRINO M.,SCUDELLER G. & CEPPELLINI R.
The agar-fluorochromasia cytotoxicity test for typing of lymphocytes and other cell types .
Histocompatibility Testing 1967,p.351, Munksgaard,Copenhagen

160 - VAN DER WEERDT C.M.
Platelets antigens and iso-immunization .
Thèse 1965 - Drukkerij "Aemstelstad" , Amsterdam

161 - VAN ROOD J.J.,EERNISSE J.G. & VAN LEEUWEN A.
Leucocyte antibodies in sera from pregnant women .
Nature, 181 : 1735 , 1958

162 - VAN ROOD J.J.
Leukocyte grouping . A method and its application .
Thèse 1962 - Drukkerij Pasmans , Den Haag

163 - VAN ROOD J.J. & VAN LEEUWEN A.
Leukocyte grouping . A method and its application .
J. Clin. Invest., 42 : 1383 , 1963

164 - VAN ROOD J.J.,VAN LEEUWEN A.,KOCH C.T. & FREDERIKS E.
HL-A inhibiting activity in serum .
Histocompatibility Testing 1970,p.483, Munksgaard,Copenhagen

165 - WALFORD R.L.
Leukocyte antigens and antibodies .
Grune & Straton Ed.,New-York 1960

166 - WALFORD R.L.,GALLAGHER R. & SJAARDA J.R.
Serologic typing of human lymphocytes with human serum obtained after homografting .
Science, 144 : 868 , 1964

167 - WALFORD R.L.,GALLAGHER R. & TROUP G.M.
Human lymphocyte typing with isologous antisera : technical considerations and a preliminary study of the cytotoxic reaction system .
Transplantation, 3 : 387 , 1965

168 - WALFORD R.L.,SHANBRON E.,TROUP G.M.,ZELLER E.,ACKERMAN B.
Lymphocyte grouping with defined antisera .
Histocompatibility Testing 1967,p.221, Munksgaard,Copenhagen

169 - WALFORD R.L.,FINKELSTEIN S.,HANNA C. & COLLINS Z.
Third sublocus in the HL-A human transplantation system .
Nature, 224 : 74 , 1969

170 - WALFORD R.L.
The iso-antigenic systems of human leukocytes .Medical and biological signifiance .
Series Haemat., 2 : 2 , 1969

171 - WEISS M.C. & GREEN H.
Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes .
Proc. Nat. Acad. Sci., 58 : 1104-1111 , 1967

172 - WIEL (VAN DER) T.W.M.,VAN DE WIEL-DORFMEYER H.,VAN LOGHEM J.J.
Studies on platelet antibodies in man .
Vox Sang., 6 : 641-668 , 1961

TABLE DES MATIERES

		Pages
I -	INTRODUCTION	
II -	NOTIONS GENERALES SUR LE SYSTEME HL-A	4
III -	MATERIEL : Les cellules utilisées	24
	Les sérums utilisés	25
	Les réactifs et matériel divers	30
IV -	METHODES DE FIXATION DU COMPLEMENT SUR PLAQUETTES ET DE LYMPHOCYTOTOXICITE	
	Généralités	37
	La RFC sur plaquettes	39
	La lymphocytotoxicité	42
V -	MISE AU POINT DES METHODES SUR FIBROBLASTES	
	- Méthode de fixation du complément	
	Préparation de la suspension cellulaire	47
	Rapport antigène-anticorps	49
	Température et durée d'incubation	56
	Les facteurs anticomplémentaires	57
	Technique définitive utilisée	59
	- Méthode de cytotoxicité	
	Préparation de la suspension cellulaire	60
	Rapport antigène-anticorps	62
	Température et durée d'incubation	64
	Technique définitive utilisée	65
VI -	RESULTATS	67
VII -	DISCUSSION	90
VIII -	CONCLUSION	100